



Marta Catarina Oliveira Carvalho

Licenciada em Ciências de Engenharia Biomédica

Fluorescência de raios-X aplicada ao estudo de ossadas humanas

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Biomédica

Orientador: Prof. Doutor António Alberto Dias,
Faculdade de Ciências e Tecnologias,
Universidade Nova de Lisboa

Co-Orientador: Prof. Doutora Sofia Pessanha,
Faculdade de Ciências e Tecnologias,
Universidade Nova de Lisboa

Júri:

Presidente: Prof. Doutora Carla Quintão
Arguente: Prof. Doutora Cecília Casaca
Vogal: Prof. Doutor Doutor António Alberto Dias

Fluorescência de raios-X aplicada ao estudo de ossadas humanas

Direitos de Cópia © Marta Catarina Oliveira Carvalho, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Aos meus avós

Agradecimentos

Em primeiro lugar, quero agradecer ao meu orientador Professor Doutor António Dias por todo o apoio, incentivo, rigor e conselhos que me ajudaram a encontrar o caminho certo nesta investigação. Agradeço também pela amabilidade e boa disposição em todos os momentos. À minha co-orientadora, a Professora Doutora Sofia Pessanha pelos ensinamentos e dicas fundamentais para a concretização desta investigação. À Professora Doutora Maria Luísa Carvalho, um agradecimento especial, pois esteve sempre disponível para me ajudar. A sua sabedoria e experiência foram essenciais para que chegasse ao fim deste trabalho com um enorme sentimento de satisfação.

Aos meus colegas de laboratório e docentes pela ajuda e colaboração essenciais na realização deste trabalho. Ao concelho de Almada, nomeadamente ao arqueólogo Fernando Henriques Robles e antropólogo Francisco Curate por apoiarem a investigação e por toda a ajuda disponibilizada.

Aos meus colegas voluntários, colaboradores e utentes da Unidade de Cuidados Continuados de Almada, por todo o carinho que recebi e por me terem dado a possibilidade de retribuir. Os meus dias na vossa casa foram muitas vezes o meu refúgio querido.

Às minhas amigas, em especial à Alexandra Silva, Carina Figueira e Inês Ramos, por partilharem comigo este dilema da tese e muitos outros, pela amizade e pela partilha dos bons (e menos bons) momentos. À minha madrinha da faculdade e amiga Inês Ropio, pelos conselhos, apoio e pelas belas caminhadas de fim da tarde que me ajudaram a desanuviar e aclarar as ideias. Ao meu amigo Filipe Peixoto pela sua eterna boa disposição e por ter o dom de sempre me fazer rir, e é claro pelas refeições e mimos partilhados. Aos meus amigos de sempre e da faculdade que apesar de não terem vivido esta experiência comigo viveram-na através de mim.

Quero deixar um agradecimento muito especial aos meus pais pelas pessoas maravilhosas que são, pelos valores que me transmitiram e por terem sempre confiado nas minhas escolhas. Ao meu irmão Tiago, meu amigo e camarada e à minha irmã Beatriz ("pipoquinha") que é a luz da minha vida. Não poderia deixar de agradecer aos meus tios Torcato, Ginha, Paulo, Eva (madrinha), Nela e Frinda por todo o carinho, apoio e união. Em especial à minha Frinda, minha melhor amiga e conselheira, pelos intermináveis desabafos no telemóvel e por partilhar comigo a sua sabedoria. Às minhas primas Sofia, Joana, Margarida, e em particular à destemida prima/irmã Mariana. Obrigada a todas pelos momentos de galhofa e pelas refeições barulhentas lá em casa.

Um agradecimento muito sentido ao meu avô Zé do Paço e à avozinha Olinda por me terem educado, pelas histórias e aconchego em dias de chuva, pelo afeto e acima de tudo pelo amor incondicional. É neles que penso, com muita saudade, quando preciso de força e coragem, e a eles dedico este trabalho.

Resumo

O trabalho desenvolvido nesta dissertação visa o estudo da composição elementar de restos humanos (séculos XVIII-XIX) por fluorescência de raios-X dispersiva em energia (EDXRF). Os tecidos analisados, ossos, dentes, cabelos e massa encefálica, pertenciam a um conjunto de corpos exumados da Ermida do Espírito Santo, em Almada (Portugal). Os resultados foram obtidos pela análise complementar de duas montagens experimentais: EDXRF com geometria triaxial e μ -EDXRF com geometria convencional. A primeira técnica permite obter melhores limites de deteção para matrizes de baixo Z. A configuração com um micro feixe e a análise em condições de vácuo permite melhorar os limites de deteção para os elementos mais leves.

Os resultados obtidos para os indivíduos analisados puderam ser correlacionados, em alguns casos, com os hábitos alimentares e com o habitat, nomeadamente a exposição a elementos tóxicos. Adicionalmente, foi também avaliada a possibilidade de contaminação *post-mortem* dos corpos, a partir do local de inumação. Os elementos detetados em ambas as técnicas foram Ca, Fe, Cu, Zn, Br, Sr e Pb. Observaram-se níveis elevados de Zn e Sr para os ossos, que são indicativos de uma dieta rica em carne e peixe, respetivamente. Alguns indivíduos revelaram concentrações elevadas de Pb e Zn na polpa do dente. Estes elementos poderão ter sido resultado de uma acumulação *ante-mortem* e indicar o hábito do tabaco. Os resultados mostram um indivíduo que apresenta concentrações bastante elevadas de Pb, especialmente na massa encefálica, polpa do dente e ossos esponjosos. A contaminação poderá ter sido resultado da exposição *ante-mortem* de Pb, eventualmente devida ao trabalho efetuado numa fundição. Ademais, outro indivíduo apresentou uma concentração elevadíssima de Hg no cabelo. Neste caso, a hipótese proposta mais provável é a aplicação de um composto à base de Hg, para fins medicinais, possivelmente para a desinfestação de piolhos.

Abstract

The work developed in this thesis aims to study the elemental composition of human remains (XVIII-XIX century) by energy dispersive X-ray fluorescence (EDXRF). The analyzed tissues, bones, teeth, hair and brain matter, belonged to a group of exhumed bodies from Ermida do Espírito Santo in Almada (Portugal). The results were obtained by analysis of two complementary setups: EDXRF with triaxial geometry and μ -EDXRF with conventional geometry. The first technique allows improved detection limits for lower Z matrices. The other setup allows micro beam as well as performing analysis under a vacuum system which improves the detection limits for lighter elements.

The results obtained for the analyzed individuals, could be correlated, in some cases, with dietary habits and environmental surroundings, in particular from exposure to toxic elements. Additionally, it also evaluated the possibility of post-mortem contamination from the surrounding soil of the burial site. The detected elements for both setups were Ca, Fe, Cu, Zn and Pb. It was observed high levels of Zn and Sr in bones, which are indicative of dietary habits rich in meat and fish, respectively. Some subjects have shown high levels of Pb and Zn in the pulp of the tooth. These elements could be a result from *ante-mortem* accumulation and may indicate smoking habits. The results show a particular individual that has high concentrations of Pb, especially in brain matter, tooth pulp and spongy bones. The contamination may have been a result of *ante-mortem* Pb exposure, possibly due to work done in a smelter. In addition, another individual showed a high concentration of mercury in the hair. The most likely possibility is the application of a mercury-based compound for medical purposes, possibly lice infestation.

Conteúdo

Resumo	ix
Abstract	xi
Lista de figuras	xvii
Lista de tabelas	xix
Lista de símbolos	xxi
Lista de siglas	xxiii
1 Introdução	1
2 Tecidos Analisados	3
2.1 Ossos	3
2.2 Dentes	4
2.3 Cabelo	5
2.4 Massa Encefálica	6
3 Elementos Essenciais e não Essenciais	7
3.1 Elementos Maioritários	8
3.1.1 Fósforo	8
3.1.2 Cálcio	8
3.2 Elementos Traço	8
3.2.1 Ferro	8
3.2.2 Cobre	9
3.2.3 Zinco	9
3.2.4 Bromo	9

3.2.5	Estrôncio	10
3.3	Elementos tóxicos	10
3.3.1	Mercúrio	10
3.3.2	Chumbo	11
4	Técnica Analítica de Fluorescência de raios-X	13
4.1	Produção de raios-X	13
4.2	Fundamentos básicos	14
4.2.1	Transições radiativas e não radiativas	14
4.2.2	Interação de raios-X com a matéria	16
4.3	Fluorescência de raios-X dispersiva em energia	17
4.3.1	Fluorescência de raios-X com geometria triaxial	18
4.3.2	Micro-Fluorescência de raios-X com geometria convencional	19
5	Materiais e Métodos	23
5.1	Descrição das amostras	23
5.2	Análise em EDXRF com geometria triaxial	23
5.2.1	Preparação de amostras	24
5.2.2	Quantificação	25
5.3	Análise em μ -EDXRF	26
5.3.1	Preparação de amostras	26
5.3.2	Quantificação	27
5.4	Limites de Detecção e Exatidão	28
6	Resultados e Discussão	31
6.1	Caso Geral	31
6.1.1	Ossos	32
6.1.2	Dentes	36
6.1.3	Cabelo e Massa Encefálica	38
6.2	Caso especial do indivíduo 31	39
6.3	Caso especial do indivíduo 54	42
7	Conclusões e perspectivas	47
7.1	Conclusões	47
7.2	Perspetivas Futuras	48

Bibliografia	49
A Anexos	57
A.1 Limites de Detecção e Exatidão	57
A.2 Artigos Publicados	60

Lista de Figuras

2.1	Representação da anatomia do dente.	5
4.1	Esquema das transições eletrônicas associadas à fluorescência de raios-X.	14
4.2	Rendimento de fluorescência e rendimento de Auger em função do número atômico. . .	15
4.3	Esquema do mecanismo do efeito fotoelétrico.	17
4.4	Esquema da montagem de EDXRF com geometria triaxial	19
4.5	Esquema do tubo com geometria <i>side-window</i>	20
4.6	Esquema da ótica policapilar.	21
5.1	Planta da Ermida do Espírito Santo com a localização dos indivíduos em estudo . . .	24
5.2	Ajuste de um espectro de osso no WinAxil.	27
6.1	Concentrações das amostras de solo ($\mu\text{g/g}$) obtidas por μ -EDXRF.	32
6.2	Concentrações de Fe, Cu e Pb nas costelas ($\mu\text{g/g}$) dos indivíduos sepultados na área 4.	33
6.3	Comparação entre as concentrações obtidas ($\mu\text{g/g}$) para os indivíduos 4, 14, 15 e 37, por EDXRF com geometria triaxial.	35
6.4	Comparação entre os ossos medidos no μ -EDXRF para todos os indivíduos (excetuando os indivíduos 54 e 31).	36
6.5	Concentrações elementares ($\mu\text{g/g}$) ao longo do dente para os indivíduos 4, 6, 14 e 83. .	37
6.6	Concentrações elementares ($\mu\text{g/g}$) das amostras de cabelo para o indivíduo 4, 6, 8, 11 e 32.	38
6.7	Concentrações elementares ($\mu\text{g/g}$) das amostras de massa encefálica para o indivíduo 6 e 17.	39
6.8	Espectro de EDXRF com geometria triaxial obtido para o cabelo do indivíduo 31. . . .	40
6.9	Espectro de EDXRF com geometria triaxial obtido para o solo de área 5.	40
6.10	Gráfico relativo às avaliações quantitativas ($\mu\text{g/g}$) das amostras de osso do indivíduo 31.	41
6.11	Mapeamento elementar obtido para uma fatia do dente 31.	42

6.12	Espetro de EDXRF com geometria triaxial obtido para as costelas do indivíduo 54 e para o solo do local de sepultamento.	43
6.13	Gráfico relativo às avaliações quantitativas ($\mu\text{g/g}$) das amostras de osso do indivíduo 54.	43
6.14	Gráfico relativo às avaliações quantitativas ($\mu\text{g/g}$) de Pb ao longo de uma fatia de tíbia do indivíduo 54.	44
6.15	Mapeamento elementar obtido para uma fatia do dente 54.	45
6.16	Gráfico relativo às avaliações quantitativas ($\mu\text{g/g}$) de Pb ao longo do dente do indivíduo 54.	45

Lista de Tabelas

5.1	Exatidão da quantificação de EDXRF com geometria triaxial do IAEA-085, DC73347 e Orchard leaves.	28
5.2	Exatidão da quantificação de μ -EDXRF para o Bovine Bone e Bone Ash.	29
5.3	LD e Exatidão no μ -EDXRF para IAEA – soil 7.	29
6.1	Concentrações de elementos traço ($\mu\text{g/g}$) em ossos humanos de indivíduos do século XX [97], e concentração do elemento cálcio ($\mu\text{g/g}$), em ossos humanos, retirada da literatura [98].	33
A.1	LD obtidos no EDXRF com geometria triaxial.	57
A.2	Exatidão da quantificação do EDXRF com geometria triaxial do Bovine Bone 05-02 e Bone Ash SRM NIST-1400.	58
A.3	LD obtidos no μ -EDXRF do Bovine Bone e do Bone Ash.	58
A.4	LD e Exatidão no μ -EDXRF para ISE- 954	59

Lista de símbolos

Ca	Cálcio
Z	Número Atômico
Sr	Estrôncio
Zn	Zinco
P	Fósforo
O	Oxigênio
H	Hidrogênio
C	Carbono
N	Azoto
Si	Silício
Co	Cobalto
Ni	Níquel
Se	Selênio
As	Arsênio
Br	Bromo
Cu	Cobre
Pb	Chumbo
Hg	Mercúrio
Fe	Ferro
Br^-	Brometo
I^-	Iodeto
I	Iodo
Ca^{+2}	Ião cálcio
Sr^{+2}	Ião Estrôncio
Pb^{+2}	Ião chumbo
E	Energia da radiação incidente
k_1	Constante dependente da linha espectral
k_2	Constante dependente da linha espectral
K	Série de orbitais com o número quântico principal igual a 1
L	Série de orbitais com o número quântico principal igual a 2
K_α	As linhas mais intensas da série K
h	Constante de Planck
ν	Frequência

W_r	Energia de ionização do nível r
W_s	Energia de ionização do nível s
W_t	Energia de ionização do nível t
ω	Rendimento de fluorescência
I_0	Intensidade inicial do feixe
I_x	Intensidade transmitida pelo material absorvedor
μ	Coefficiente linear de atenuação
ρ	Densidade
x	Espessura
c	Velocidade da luz no vácuo
m_0	Massa do elétron em repouso
θ	Ângulo entre a direção da radiação incidente e a direção da radiação emitida
E_γ	Energia do fóton incidente
E_l	Energia de ligação do elétron
E_c	Energia Cinética
Li	Lítio
Be	Berílio
Mo	Molibdénio
W	Tungsténio
Rh	Ródio
θ_i	Ângulo incidente na superfície do vidro
θ_c	Ângulo crítico
K_β	As segundas linhas mais intensas da série K
I_i	Intensidade de um pico característico de um elemento i
C_i	Concentração do elemento i na amostra
K	fator de calibração experimental
A_i	fator de atenuação
m	massa da amostra
$\mu(E_{(0,j)})$	Coefficiente de atenuação para o elemento j para a energia E_0 do fóton
$\mu(E_{(i,j)})$	Coefficiente de atenuação para o elemento j , para a energia E_i do fóton
E_i	Energia da radiação característica do elemento i
E_0	Energia da radiação incidente
θ_1	Ângulo da radiação incidente
θ_2	Ângulo da radiação emitida pela amostra
Ω	Ângulo sólido do detetor
ε_i	Eficiência
C'_i	Absorção da radiação na janela do detetor e no ar
σ_i	Secção eficaz de ionização
ω_i	Rendimento de fluorescência do elemento i
$P_{(n-m)}$	Probabilidade de transição do nível n para o nível m , do elemento i
Zr	Zircónio
α_i	Fator que engloba a atenuação da radiação de entrada e a radiação característica de saída
c_i	Concentração do elemento i
n_B	Taxa de contagem para o fundo
n_p	Taxa de contagem para o pico correspondente
S	Enxofre

Lista de siglas

AAS	<i>Atomic Absorption Spectrometry</i>
ADN	Ácido desoxirribonucleico
EES	Ermida do Espírito Santo
EDXRF	Fluorescência de raios-X dispersiva em energia
et al.	<i>et alii</i> (e outros)
IAEA	<i>International Atomic Energy Agency</i>
XRF	Fluorescência de raios-X
ISE	<i>International Soil-Analytical Exchange</i>
LD	Limite de detecção
NIST	<i>Nacional Institute for Standards Technology</i>
NYS	<i>New York State</i>
PCA	Análise de Componentes Principais
RM	<i>Reference Material</i>
SDD	<i>Silicon Drift Detector</i>
SRM	<i>Standard Reference Materials</i>
w/w	peso (do soluto) por peso (do solvente)

Capítulo 1

Introdução

A Ermida do Espírito Santo (EES), localizada na cidade de Almada (Portugal), foi provavelmente erigida no século XV, embora a sua construção seja apontada em torno do século XIV, por alguns autores [1]. Após o Terramoto de Lisboa de 1755, a EES passou a funcionar como nova sede de paróquia de Santa Maria do Castelo. Em consequência, a Ermida terá sido frequentemente utilizada como espaço sepulcral até ao final do século XVIII. Existem porém, registos posteriores a esta data, sendo que as últimas inumações terão sido efetuadas entre 1800 e 1833. Pelo que se pôde constatar, aquando da ocorrência destes últimos sepultamentos, a EES já teria perdido o estatuto de paróquia, funcionando apenas como uma filial da sede de paróquia [2].

A reestruturação da EES, promovida pela Câmara Municipal de Almada, permitiu a plena intervenção arqueológica da Ermida abandonada. Assim, no decurso da escavação arqueológica realizada entre 2010 e 2011 foram recuperados os restos mortais de 83 indivíduos [3], dos quais 15 foram objeto de estudo no âmbito do presente trabalho. Atualmente, este imóvel renomeado como Centro de Interpretação de Almada Velha, alberga uma exposição interativa para a descoberta da história e da memória da velha cidade.

Neste trabalho foi realizado o estudo de elementos traço em ossos, dentes, cabelo e massa encefálica de indivíduos do século XVIII, por fluorescência de raios-X dispersiva em energia (EDXRF). A determinação da concentração elementar foi efetuada em duas montagens: EDXRF com geometria triaxial e μ - EDXRF com geometria convencional. O estudo com a primeira montagem decorreu no Complexo Interdisciplinar da Universidade de Lisboa, enquanto que o segundo decorreu no laboratório de Física Atómica e Molecular, do Departamento de Física da Faculdade de Ciências e Tecnologias da Universidade Nova de Lisboa. A técnica de EDXRF com geometria triaxial permite a obtenção de melhores limites de deteção para matrizes de baixo Z, e por sua vez a análise por μ - EDXRF realizada sob condições de vácuo é ideal para a deteção de elementos leves. Ademais, na primeira montagem experimental foram medidos ossos, cabelos e massa encefálica, sendo que na segunda montagem mediram-se também os ossos e ainda os dentes. A utilização de duas técnicas de forma complementar permitiu também concluir sobre a viabilidade e a conformidade das mesmas em relação aos tecidos analisados.

Os elementos traço caracterizam-se por serem elementos químicos em quantidades reduzidas, conhecidos por se acumularem nos tecidos. Estes elementos podem ser essenciais, ou não essenciais para o organismo vivo. Ao determinar o perfil elementar de restos humanos mineralizados, é possível aferir sobre os hábitos alimentares, nível de vida e ainda condições ambientais e/ou trabalho das populações. Para além disso, o padrão de difusão de alguns elementos, pode conceder informações sobre doenças, tratamentos médicos, condições de trabalho e classe social. Na atualidade, vários investigadores já utilizaram técnicas de fluorescência de raios-X (XRF) para determinar a toxicidade de elementos traço no organismo [4, 5, 6, 7]. Apesar dos avanços da medicina e das técnicas analíticas para a determinação elementar em tecidos humanos, ainda existe uma grande falta de informação sobre os elementos traço encontrados nos tecidos. Deste modo, com este trabalho pretendeu-se dar um contributo ao conhecimento desses valores, que podem ajudar a compreender o papel de cada elemento no desenvolvimento de uma certa patologia ou no seu tratamento. Para além disso, a determinação elementar em populações antigas permite avaliar a evolução dos hábitos do dia-a-dia, das práticas medicinais e condições ambientais. Este conhecimento é importante para o campo da biomedicina pois a partir da descoberta de erros passados é possível encontrar soluções para o futuro.

Esta dissertação encontra-se dividida em 7 capítulos. No capítulo 1 é apresentada uma breve introdução sobre os objetivos e aspetos gerais do trabalho, sendo descrita a origem das amostras que possibilitaram a concretização do mesmo. O capítulo 2 é dedicado à descrição dos tecidos humanos em estudo, bem como de características específicas dos mesmos que facilitem a análise dos resultados. Por sua vez, o capítulo 3 apresenta uma breve definição dos elementos relevantes para o estudo. Os fundamentos teóricos das técnicas de XRF são explicitados no capítulo 4. De seguida o capítulo 5 descreve com detalhe as amostras medidas bem como os equipamentos e as condições de medição. Ademais, também são indicados os métodos de quantificação, os limites de deteção e exatidão de cada técnica. Os resultados obtidos e respetiva análise são apresentados no capítulo 6. Por fim, o último capítulo resume-se às conclusões obtidas e às propostas futuras de acordo com o desenvolvimento deste trabalho.

O trabalho desenvolvido nesta dissertação deu origem a dois artigos que já foram publicados e a outro em fase de conclusão. Os artigos publicados intituam-se: *Quantitative analysis of human remains from 18th–19th centuries using X-ray fluorescence techniques: The mysterious high content of mercury in hair* e *Quantitative evaluation on ante-mortem lead in human remains of the 18th century by triaxial geometry and bench top micro X-ray fluorescence spectrometry*. Por sua vez, o artigo em fase de conclusão inclui os nomes de todos os colaboradores neste projeto sendo intitulado: *Elemental characterization of human remains from Ermida Espírito Santo using EDXRF* (Anexo A2).

Capítulo 2

Tecidos Analisados

A partir de tecidos humanos, como ossos, dentes e cabelos, é possível avaliar a exposição de dose e determinar a distribuição elementar a que o indivíduo foi exposto, tanto *post-mortem*, como *ante-mortem* [4, 8]. Alguns elementos são incorporados no material mineralizado do esqueleto *in vivo*, o que pode contribuir com informações ambientais e de economia alimentar sobre as populações. Por sua vez, a incorporação *post-mortem* está relacionada com a contaminação do solo circundante ao local de inumação [9].

As alterações diagenéticas ocorrem por meios de precipitação, erosão, dissolução, recristalização e reposição mineral. Estes processos são responsáveis pela captação e difusão de elementos químicos, que alteram a composição dos restos humanos. Dependendo do local de inumação, os ossos são submetidos a várias transformações. Em primeiro lugar, a matéria orgânica separa-se do mineral inorgânico do osso, conhecido como hidroxiapatite, posteriormente ocorre a mineralização, eventualmente acompanhada de dissolução de acordo com reações ácido-base [10].

Neste trabalho, a fluorescência de raios-X foi o método aplicado para a análise e quantificação de elementos traço em tecidos humanos. Os tecidos analisados neste trabalho foram: ossos, dentes, cabelos e massas encefálicas. Em estudos anteriores, a fluorescência de raios-X demonstrou ser uma técnica adequada para a investigação dos tecidos anteriormente referidos [4, 9, 10, 11, 12, 5, 13].

2.1 Ossos

O osso é um tecido complexo altamente poroso e permeável. É uma estrutura dinâmica que está em constante renovação, sendo sensível a influências metabólicas, nutricionais e endócrinas. O crescimento do osso é caracterizado por ser aposicional, pois ocorre em camadas sobre a superfície externa do osso. De acrescentar que no osso não ocorre crescimento intersticial como acontece na cartilagem [14]. Na superfície externa do osso, os osteoblastos e o perióstio formam o osso compacto, enquanto que a cavidade interna do osso é revestida por endóstio e osteoblastos [15].

Relativamente à sua constituição, o osso tem uma componente orgânica (20-25%) e uma componente inorgânica (75% dos quais 5% são água) [16]. A fração orgânica é formada essencialmente por colagéneo (proteína fibrosa e insolúvel)[17], células especializadas, e por uma componente não fibrilar (amorfa). O colagéneo de tipo I é o componente orgânico maioritário do osso (90% da parte orgânica do osso). A componente amorfa da parte orgânica preenche os espaços à volta das fibras de colagéneo e dos cristais de hidroxiapatite [14]. Tanto o colagéneo como a substância amorfa resultam da secreção dos osteoblastos e dos osteócitos. Por último, a fração inorgânica (mineral) é formada por fosfato de cálcio conhecido como hidroxiapatite, $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$. Os cristais de hidroxiapatite são encontrados nas fibras de colagéneo e ao redor das mesmas. De referir que pequenas quantidades de outras substâncias como o flúor, e o cloro podem substituir os componentes da hidroxiapatite e assim influenciar as propriedades mecânicas do osso.

Ao nível mecânico, o osso pode distinguir-se entre osso compacto (exterior) e esponjoso (interior). No que concerne ao primeiro, é caracterizado por ser sólido com pequenos espaços para lacunas de osteócitos, vasos sanguíneos e cavidades de erosão. O osso compacto é responsável por conferir proteção e definir a forma do osso. Relativamente ao osso esponjoso, existem amplos espaços entre os canais e as placas do osso, nunca formando células fechadas, o que se traduz numa elevada porosidade, visível a olho nu [18]. Estas lacunas são chamadas de trabéculas ósseas e conferem ao osso elasticidade. Para além disso, o cálcio ocupa 80-90% do volume do osso compacto, mas apenas 15-25% do volume do osso esponjoso [16]. Contudo, apesar da maior parte do Ca estar localizado no osso compacto, o Ca do osso esponjoso é mais facilmente libertado na corrente sanguínea quando necessário [19].

Além disso, o osso é considerado um bom bio-indicador da concentração de alguns elementos traço ao longo da vida, devido à sua significativa taxa de renovação. Porém, a estrutura morfológica esparsa do osso esponjoso também o torna suscetível a alterações *post-mortem* [20]. De salientar que alguns estudos sugerem que o osso esponjoso é mais suscetível à contaminação *post-mortem*, e por outro lado, o osso compacto é representativo da ingestão *in vivo* [8, 20].

2.2 Dentes

Os dentes são constituídos por quatro componentes principais: esmalte, dentina, cimento e polpa (ver Figura 2.1). O esmalte (1-Figura 2.1) é considerado o material mais duro e mais denso do corpo humano. Em relação à dentina (2-Figura 2.2), o maior constituinte do dente que é recoberto pelo esmalte, sabe-se que apresenta uma constituição similar à do osso. Na sua composição apresenta 20% de colagéneo e outro material orgânico, 70% de mineral, maioritariamente na forma de hidroxiapatite, e 10% de água [18]. No exterior da dentina está afixado um tecido, designado por cimento (7-Figura 2.1) que pode ser remodelado durante o crescimento e movimento do dente. Para além disso, o cimento auxilia na manutenção das fibras colagénias do ligamento periodontal, que une os dentes ao osso em que se encontram [18]. O tecido da polpa está localizado no centro do dente, dentro da cavidade pulpar. Este tecido conjuntivo mole é irrigado por vasos sanguíneos e terminações nervosas. A cavidade da polpa está dividida entre a câmara da polpa (3-Figura 2.1) que representa a maior porção da polpa (localizada na coroa do dente), e canais ou canal da polpa (6-Figura 2.1) (localizado(s) na raiz do dente) [21].

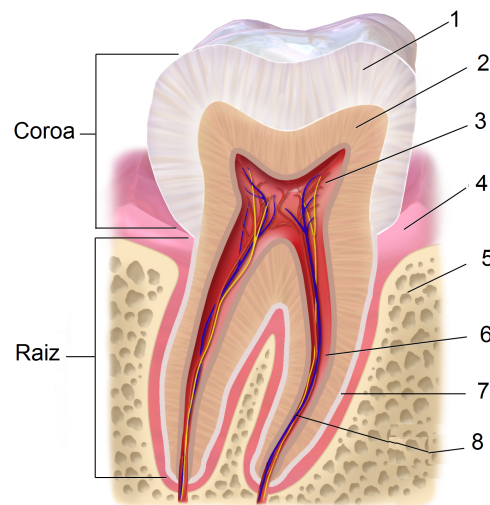


Figura 2.1: Representação da composição do dente formado pela coroa (parte branca visível do dente) e pela raiz (parte responsável pela implantação do dente no osso). 1-Esmalte; 2-Dentina; 3-Câmara da Polpa; 4-Gengiva; 5-Osso; 6-Canal da Polpa; 7-Cimento; 8-Vasos Sanguíneos e Terminações Nervosas. Adaptado da Ref.[22].

De entre as estruturas do dente, a polpa é a responsável pela nutrição, suporte e manutenção da dentina. À medida que uma pessoa envelhece, a porção da polpa tende a diminuir em tamanho, ocorrendo a calcificação da mesma [21]. Por sua vez, o esmalte possui uma maior resistência ao desgaste que a dentina. Ademais, o esmalte não possui espaços porosos, sendo praticamente impermeável, a menos que seja fraturado ou em caso de infiltrações por bactérias. De notar que para além de ser o tecido mais calcificado do corpo humano, o esmalte é uma substância dificilmente substituível com eficácia por materiais artificiais de reconstrução [23].

Em relação à dentina, esta é menos densa que o esmalte mas mais dura que o osso. Em consequência destas propriedades diferentes, os processos diagenéticos ocorrem mais lentamente no esmalte do que na dentina e no osso [24]. Em consequência das alterações diagenéticas, os elementos constituintes da dentina e do osso podem suportar aumentos de mais de uma ordem de magnitude. Além disso, estas alterações também podem resultar numa diminuição da concentração elementar da dentina e do osso, por um fator de 3 ou mais [24].

2.3 Cabelo

O cabelo é um filamento, maioritariamente constituído por uma série de proteínas fibrosas (queratina) e água, que deriva do folículo piloso. O folículo piloso é responsável pelo crescimento contínuo do cabelo. Na base do folículo está uma glândula sebácea responsável pela produção do sebo que lubrifica o fio de cabelo. Parte do cabelo, nomeadamente a raiz, permanece escondida no folículo piloso. A parte visível do cabelo é designada por haste capilar. Cada fio de cabelo encontra-se dividido em 3 partes: medula (camada interna), córtex (camada intermédia) e cutícula (camada externa). No córtex da haste capilar encontra-se a melanina que é o pigmento responsável pela cor do cabelo [25].

O cabelo humano é um dos tecidos mais acessíveis para analisar devido à sua facilidade de recolha, de armazenamento, e pela sua robustez contra a deterioração. Ademais, as estruturas químicas do cabelo possuem características físicas únicas. As fortes ligações de dissulfureto, que unem as cadeias adjacentes de queratina dão origem a uma estrutura extremamente resistente a degradações químicas e biológicas [26].

Além disso, fornece um registo cronológico do metabolismo e do ambiente do indivíduo em estudo [27]. Deste modo, a análise do cabelo tem o potencial de oferecer um meio conveniente e único para a avaliação de indivíduos e populações. A composição do cabelo é influenciada pela idade e pelo género do indivíduo. No entanto, ainda hoje é bastante complicado concluir, o que uma determinada concentração analítica no cabelo significa [26].

2.4 Massa Encefálica

O cérebro é um dos maiores e mais complexos órgãos do corpo humano. Este órgão é dividido em várias áreas com funções especializadas: córtex, tronco cerebral, gânglio basal e cerebelo. No cérebro podem ser também distinguidas duas substâncias, a massa cinzenta e a massa branca. A primeira é constituída por neurónios e corpos celulares, enquanto que a segunda contém os axónios. A distribuição da massa cinzenta e da massa branca difere significativamente de uma região do cérebro para outra, assim como a morfologia e a disposição dos neurónios [28].

A massa encefálica (cérebro) é considerada um dos alvos preferidos para a deposição de metais pesados, sendo um bom indicador de longo alcance da exposição [4]. Atualmente podem encontrar-se diversos estudos que visam a estabelecer relações entre doenças neuro-degenerativas com a presença de alguns metais no cérebro [29]. Contudo, maior parte da informação disponível sobre a relação dos elementos traço e o funcionamento do cérebro é baseada em estudos com animais [30, 31, 32, 33], e limitados ao estudo da distribuição de metais pesados [34, 32].

Os grupos de M.T. Rajan *et al.* [35] e de N. Krebs *et al.* [36] verificaram através da técnica de espectroscopia de plasma acoplado, que as concentrações elementares no cérebro variam de região para região. Segundo Krebs *et al.*, existe uma acumulação dependente da idade para o cálcio, magnésio, cobre e zinco em certas regiões do cérebro. Noutro estudo, a fluorescência de raios-X foi aplicada de forma a determinar a distribuição e a densidade de elementos traço em tecidos cerebrais de pacientes com novos neurofibrilares [34].

Capítulo 3

Elementos Essenciais e não Essenciais

No organismo humano existe uma série de elementos químicos que são essenciais para o correto funcionamento do sistema biológico. A carência destes elementos pode causar deficiências nas funções metabólicas de um organismo, que podem ser reversíveis se este voltar às concentrações adequadas. Ademais, sem um elemento essencial o organismo não evolui nem completa o seu ciclo vital, sendo que nenhum análogo pode conseguir o mesmo efeito no organismo [37]. Estes elementos dividem-se em 3 categorias: maioritários, traço e ultra-traço. De entre os elementos maioritários, apenas 4 (C, O, H, N) constituem cerca de 96% da massa do corpo humano [38]. Os elementos ultra-traço, como o Si, Co, Ni, Se e As, apresentam muito pouco ou quase nada dessas partículas no organismo (menos de 1 $\mu\text{g/g}$) [39]. Os elementos traço, como o Zn, Br e Cu, são componentes essenciais em diversos processos biológicos e estão presentes em quantidades reduzidas no organismo humano [38].

Em oposição, um elemento é tóxico para um organismo quando presente em concentrações superiores às adequadas, prejudicando o desenvolvimento e as funções metabólicas do mesmo. Assim, mesmo um elemento essencial é tóxico quando ocorre um aumento desmesurado da sua concentração, quer seja através da dieta ou através de outras fontes de exposição [40]. No entanto, existem elementos que são tóxicos mesmo em concentrações muito baixas. O Pb e o Hg são dois exemplos de elementos tóxicos mesmo em concentrações muito reduzidas, que apresentam carácter cumulativo, não sendo conhecida qualquer função metabólica dos mesmos [41].

A maior parte dos elementos tóxicos são produzidos como resultado da poluição causada pelo ser humano. Estas substâncias podem desaparecer através da ação biológica dos organismos vivos ou devido a ações climáticas [37]. Todavia, também podem permanecer no ambiente por períodos de tempo consideráveis, causando problemas graves, caso a toxicidade seja elevada [40].

A seguir será apresentada uma breve informação sobre os elementos essenciais e não essenciais estudados, cuja compreensão é relevante para este trabalho.

3.1 Elementos Maioritários

3.1.1 Fósforo

O fósforo (P) é um elemento químico essencial que constitui cerca de 1% da massa do corpo humano. O P é um dos componentes dos fosfolípidos, ácidos nucleicos e adenosina trifosfato. Além disso, desempenha um papel importante na transferência de energia na forma de fosfato de adenosina.

O ser humano requer na sua dieta um consumo de P, de aproximadamente 1,3 g por dia [42]. O peixe e os derivados de leite são uma importante fonte de P, sendo que este elemento é armazenado nos nossos ossos sob a forma de fosfato de cálcio. A carência deste elemento pode conduzir ao raquitismo em crianças e adultos, tornando-se os ossos porosos, frágeis e quebradiços [43]. Contudo, um excesso de P na dieta pode levar a uma escassez de cálcio, e em consequência a sintomas de hipoglicemia [42].

3.1.2 Cálcio

O cálcio (Ca) é parte integrante do conteúdo mineral do osso conhecido como hidroxiapatite [5], sendo o metal mais abundante do corpo humano (1,5% da massa total), concentrado principalmente no esqueleto (99%) [37]. Este é um elemento essencial no desenvolvimento do esqueleto, na formação e rigidez de ossos e dentes. Para além disso, desempenha um papel fundamental na secreção hormonal, controlo dos músculos e dos mecanismos de coagulação do sangue.

Ademais, o Ca apresenta uma elevada afinidade e seletividade de ligação podendo associar-se e desassociar-se com rapidez [44]. Boa parte do Ca de que precisamos é ingerida através dos derivados de leite, ovos e verduras [43]. O cálcio é absorvido dos alimentos pelo trato gastrointestinal, existindo diversos fatores que aumentam a sua capacidade de absorção tais como pH, a vitamina D, algumas proteínas, fosfatos e lactose [37].

3.2 Elementos Traço

3.2.1 Ferro

O ferro (Fe) encontra-se presente em todas as células de um organismo vivo, intervindo no metabolismo proteico e em várias reações enzimáticas. No corpo humano, 2/3 do Fe existente faz parte da constituição da hemoglobina e 15% está presente na mioglobina do tecido muscular [45]. Desta forma, o Fe desempenha um papel importante no transporte, armazenamento e utilização do oxigénio [37].

O ferro disponível nos alimentos pode ser de dois tipos: Fe *heme* e Fe *não-heme*. O primeiro é encontrado em alimentos de origem animal, que contêm hemoglobina e mioglobina, tais como carnes vermelhas, peixes e aves. Em relação ao Fe *não-heme*, este é encontrado em alimentos de origem vegetal: lentilhas e feijão. A maior parte do Fe ingerido é de origem *não-heme*, apesar de o Fe *heme* ser mais facilmente absorvido pelo organismo [38].

A ingestão total de ferro varia entre 14,4 - 20,2 mg/dia [38]. Num homem adulto o teor de Fe é cerca de 4 g, diminuindo para cerca de 3 g em mulheres menstruadas [38]. A intoxicação crónica do ferro é frequentemente associada a doenças genéticas e metabólicas, transfusões de sangue seguidas ou ingestão excessiva [38]. Por outro lado, a forma mais severa de deficiência de Fe é a anemia, sendo que a sua carência também pode ser prejudicial para o progresso normal de uma gravidez [37].

3.2.2 Cobre

O cobre (Cu) é um elemento traço essencial para o desenvolvimento do tecido conjuntivo, revestimento de nervos e osso. Também é um elemento necessário para a manutenção química do sangue, estando distribuído de forma similar no plasma e nas células. Contudo, sabe-se que os níveis de cobre aumentam em várias infeções, sendo seguido de um aumento da taxa de sedimentação [38].

No organismo de um indivíduo adulto existem cerca de 80 mg de Cu, sendo que as concentrações mais elevadas verificam-se no fígado e no cérebro. Em relação a fontes alimentares de Cu, pode-se destacar o fígado (e outras vísceras de animais), nozes, chocolate negro e as ostras. Apesar da deficiência deste elemento ser rara, quando ocorre pode conduzir a anemia normocítica e hipocrómica, leucopenia e neutropenia, e inclusive a osteoporose em crianças [38]. Além disso, uma dieta com um excesso de Zn também pode causar uma deficiência de Cu. A acumulação de Cu no organismo humano está associada à exposição pelo ambiente, colesterol, cirrose, hipertensão e taquicardia [37]. Os casos de intoxicação severa por Cu conduzem a efeitos gastrointestinais, caracterizados por dor abdominal, câibra, náuseas, vômitos e diarreia [38].

3.2.3 Zinco

O zinco (Zn) desempenha um papel essencial em múltiplos processos biológicos, sendo um componente essencial na atividade de várias enzimas (mais de 100 enzimas). Para além disso, é também considerado um indicador de hábitos alimentares [12], nomeadamente o consumo de carnes vermelhas e de aves, moluscos, mas também de certos legumes e vegetais [13, 20]. No corpo humano, existe aproximadamente 2-3 g de Zn, e cerca de 1 mg/L no plasma [38].

O envolvimento em processos fisiológicos tais como o crescimento, a reprodução e sistema imunológico dependem de uma ingestão regular de Zn. Numa dieta normal, a dose diária recomendada de Zn é de 6-22 mg [37]. A deficiência de Zn no organismo humano está normalmente associada à desnutrição, afetando o sistema imunológico, a cicatrização de feridas, os sentidos do paladar e olfato, e prejudicando a síntese de ADN [38]. A toxicidade por Zn pode ocorrer tanto na forma aguda como na forma crónica (como a deficiência de Cu induzida por excesso de Zn) [46].

3.2.4 Bromo

O bromo (Br) é um elemento que se encontra no estado líquido à temperatura ambiente. Este líquido apresenta uma cor avermelhada sendo instável, denso e volátil. Para além disso, é altamente reativo, reagindo facilmente com muitos elementos [37]. A toxicidade é elevada, com sérios riscos para a saúde, como danos nos rins, cérebro e sistema nervoso, possuindo uma dose letal de apenas 14µg/g [47].

No corpo humano, este elemento é encontrado em pequenas quantidades, não sendo ainda conhecida nenhuma contribuição nas funções vitais do organismo [47]. Os níveis de Br no organismo humano advêm principalmente da alimentação, nomeadamente de uma dieta rica em peixe [13]. Ademais, este elemento é facilmente absorvido pelo corpo humano, encontrando-se frequentemente na saliva [47].

Em média, são ingeridos diariamente 2 a 8 mg deste elemento, sendo que esta pequena quantidade não apresenta toxicidade para o ser humano. No entanto altos níveis de Br podem causar sérios problemas de saúde, como a deficiência de iodo. O Br forma brometos (Br^-), que depois substituem outros halogéneos que são essenciais para a saúde, como é o caso do I^- . A glândula da tiróide não distingue o bromo do iodo, sendo que este último é facilmente substituído pelo primeiro, impedindo o correto funcionamento da tiróide [47].

3.2.5 Estrôncio

O estrôncio (Sr) é um elemento químico que desempenha um papel semelhante ao Ca no metabolismo humano, não sendo por isso considerado um elemento tóxico. Pelo facto de ser quimicamente similar ao Ca, o estrôncio pode substituí-lo muito facilmente, sendo que o seu conteúdo no osso está associado à dieta [13, 9, 20], especialmente consumo de proteína de origem marítima, legumes e produtos lácteos. Deste modo, se o Sr estiver no estado de oxidação +2 os seus iões (Sr^{+2}) podem substituir facilmente os iões Ca^{+2} no nosso organismo, acumulando-se preferencialmente nos ossos [48].

As maiores fontes de exposição de Sr são a comida e a bebida, estimando-se que se ingira na dieta alimentar cerca de 1,9 mg/dia deste elemento [37]. Nos adultos o Sr incorpora-se na parte superficial do osso. Nas crianças em processo de crescimento, o Sr pode ser utilizado para criar a matriz de hidroxiapatite, podendo permanecer armazenado no osso por um longo período de tempo (anos). O estrôncio, à medida que o osso cresce, é dissolvido localmente e volta a circular na corrente sanguínea, onde pode ser reutilizado por outro osso em crescimento, ou então eliminado (fezes e transpiração) [48].

3.3 Elementos tóxicos

3.3.1 Mercúrio

O mercúrio (Hg) é um composto altamente tóxico que pode ser encontrado na sua forma elementar (forma metálica), e em formas orgânicas e inorgânicas [49]. Este elemento pode entrar no meio ambiente a partir de fontes naturais (vulcões, fogos florestais) bem como de atividades humanas (queima de combustíveis fósseis, exploração mineira) [37]. O seu excesso no organismo humano pode causar lesões graves e até mesmo levar à morte. Os envenenamentos por mercúrio são caracterizados por um conjunto de sinais como tremores, demência, gengivites, ataxia e eritismo [50]. Para um adulto de 70 kg, a dose de Hg tolerável é de 0,35 mg Hg/semana, e 0,2 mg no caso de ser metilmercúrio [37].

A exposição ao mercúrio pode dar-se através da inalação de vapores, pela ingestão de alimentos, ou por contacto direto com a pele [51]. No entanto, nem todas as formas de mercúrio podem entrar no nosso corpo, mesmo em contacto com a pele. Do ponto de vista toxicológico, as formas mais perigosas são: a forma metálica, as formas bivalentes inorgânicas e compostos de metilmercúrio [52]. No meio ambiente a maior parte do Hg é encontrado na sua forma metálica e sob a forma de compostos inorgânicos [49].

Alguns componentes inorgânicos do Hg não vaporizam normalmente à temperatura ambiente como o Hg elementar. Deste modo, caso sejam inalados ou ingeridos não é expectável que penetrem tão facilmente no organismo humano como o mercúrio metálico [49]. Além disso, o Hg inorgânico acumula-se preferencialmente nos rins, e não atinge o cérebro tão facilmente como o Hg metálico. Contudo uma pequena quantidade de Hg inorgânico pode ser transformada pelo organismo em Hg metálico e sair na respiração como vapor de mercúrio [49].

3.3.2 Chumbo

O chumbo (Pb) é um metal pesado altamente tóxico, cuja presença no corpo humano pode ter efeitos nocivos, independentemente da via de exposição. Ademais, o Pb é um análogo biológico do Ca [53], uma vez que os iões Pb^{2+} podem substituir facilmente os iões Ca^{2+} no organismo humano, por longos períodos. Este metal pode existir tanto na forma orgânica como na forma inorgânica. O Pb orgânico (anteriormente presente na gasolina) pode ser mais tóxico que o Pb inorgânico (tintas, canos, munições, cerâmicas), pois o corpo humano absorve-o mais facilmente [54].

A exposição do ser humano ao Pb advém principalmente da dieta alimentar e da sua inalação direta. Com a revolução industrial verificou-se um aumento significativo na ingestão dietética de chumbo [55, 56]. No passado, as fundições operacionais foram responsáveis pela contaminação das populações vizinhas [57] e dos seus trabalhadores [58, 59]. Sabe-se também que as crianças que vivem em habitações contaminadas por chumbo (poeira doméstica, tintas à base de Pb) apresentam níveis significativamente mais elevados de Pb que os adultos [60]. O alvo principal da toxicidade do chumbo é o sistema nervoso, tanto em adultos como em crianças. Altos níveis deste metal no organismo humano podem causar anemia, conduzir a danos severos nos rins e cérebro, e em último caso conduzir à morte. Nas mulheres grávidas, uma exposição elevada pode levar ao aborto, e conduzir à infertilidade nos homens [54].

A mobilidade do Pb é especialmente maior em solos ácidos [61]. Quando o Pb chega ao solo, adere-se fortemente às partículas do mesmo permanecendo nas camadas superiores [54]. Por esta razão, é que o chumbo utilizado na gasolina, pinturas da casa e pesticidas está presente no solo numa quantidade bastante significativa [54]. Além disso, o Pb permanece unido às partículas do solo e sedimentos da água por muitos anos [54]. A distribuição de Pb nos tecidos humanos é alvo de vários trabalhos experimentais [8, 20, 55], e os seus níveis no osso têm sido associados a exposição a uma ou mais fontes antropogénias [5]. Os níveis de chumbo no osso são conhecidos por apresentar variâncias entre o osso compacto e osso esponjoso, entre homens e mulheres, e ainda entre a idade do indivíduo [53].

Capítulo 4

Técnica Analítica de Fluorescência de raios-X

4.1 Produção de raios-X

Os raios-X são ondas eletromagnéticas que foram descobertas em 1895 por Wilhelm Conrad Röntgen na Universidade de Würzburg. O intervalo do comprimento de onda dos raios-X situa-se entre os raios gama e a radiação ultravioleta, de 0,01 a 10 nm (aproximadamente 0,125 a 125 keV) [62]. A análise analítica por raios-X baseia-se no facto de todos os elementos emitirem uma radiação característica quando submetidos a uma fonte de excitação [63]. A produção de raios-X pode ocorrer por três mecanismos: *i*) desaceleração de partículas carregadas (elétrões, prótons, íões e partículas α), *ii*) transições eletrónicas de elétrões nas camadas internas dos átomos, e por último, *iii*) decaimento de fontes radioativas. Para os propósitos analíticos deste trabalho, apenas serão abordados os dois primeiros processos.

No que se refere ao primeiro mecanismo, também designado por emissão de *Bremsstrahlung*, produz-se um espectro contínuo que resulta da desaceleração de partículas de elevada energia, onde a energia cinética é convertida em radiação eletromagnética [64].

O segundo processo baseia-se em transições eletrónicas, em que uma radiação de elevada energia é utilizada para ionizar os níveis internos dos átomos constituintes da amostra [65]. A radiação resultante deste processo denomina-se por fluorescência e a energia resultante, E , depende do número atómico do átomo que a emite, segundo a lei de Moseley [66],

$$E = k_1(Z - k_2)^2 \quad (4.1)$$

onde k_1 e k_2 são constantes específicas para cada linha espectral e Z corresponde ao número atómico do elemento correspondente.

4.2 Fundamentos básicos

A fluorescência de raios-X (XRF) é um método de análise elementar quantitativo e qualitativo, que fornece um meio de identificação de um elemento ($Z > 13$), através da medição do seu comprimento de onda ou energia de emissão de raios-X característico [67]. Este mecanismo baseia-se no princípio de ionização de um átomo e no facto de que todos os elementos emitirem uma radiação característica quando submetidos a uma fonte de excitação externa [63]. A Figura 4.1 ilustra os processos das transições eletrónicas associadas à fluorescência de raios-X, em que a energia pode ser emitida como eletrão (Efeito de Auger), ou como fóton (raios-X) [68].

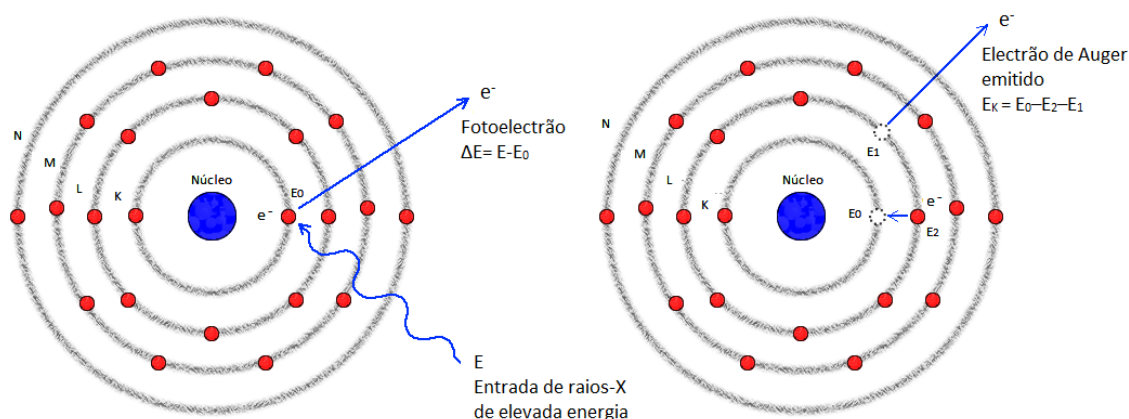


Figura 4.1: Esquema das transições eletrónicas associadas à fluorescência de raios-X. Adaptado da Ref. [69].

A energia do fóton de raios-X emitido depende da diferença entre as energias de ligação dos níveis envolvidos, que é característica para cada elemento [65]. Por conseguinte esta dependência da energia da radiação emitida, com o número atómico do átomo emissor pode ser utilizada para a análise quantitativa e qualitativa. A análise quantitativa diz respeito à determinação dos elementos presentes numa dada amostra obtendo a sua quantidade relativa. Já na análise qualitativa, a informação é obtida pela observação do espectro e consequente identificação das riscas K_α e L_α do mesmo.

4.2.1 Transições radiativas e não radiativas

As transições eletrónicas de átomos ionizados em níveis interiores (K, L,...) podem ser designadas por transições radiativas ou não radiativas [66]. No caso de um fóton com energia superior à energia de ligação de um elétron, interagir com um elétron ligado, parte da sua energia é absorvida pelo elétron, que depois é ejetado. Deste modo, é criada uma lacuna dentro das camadas internas do átomo sendo que um elétron de uma camada externa irá preencher essa lacuna, podendo causar a emissão de um fóton de raios-X. Este processo radiativo repete-se sucessivamente com emissão de fótons até que a lacuna se posiciona no exterior do átomo, que será por sua vez preenchida por um elétron livre do meio, e, assim o átomo retorna ao seu estado fundamental [62, 68]. Assim, neste caso há emissão de radiação X, de energia:

$$h\nu = W_r - W_s \quad (4.2)$$

sendo que h é a Constante de Planck, ν é a frequência, W_r é a energia de ionização do nível r , e W_s a energia de ionização do nível s .

Em alternativa, numa transição não radiativa que se denomina Efeito de Auger, um ião pode retornar ao estado de mais baixa energia ao ejetar um eletrão de um estado menos ligado [66]. A energia $W_r - W_s$ provoca a emissão de um eletrão de Auger do nível t , por exemplo, desde que seja

$$W_r - W_s > W_t, \quad (4.3)$$

onde W_t é a energia de extração eletrónica do nível t , de um átomo já previamente ionizado noutro nível.

Quando um átomo está ionizado tem um eletrão a menos, e com o efeito de Auger outro eletrão é ejetado. Assim, este efeito provoca uma nova lacuna no átomo, ficando este duplamente ionizado [62]. No entanto se a lacuna for preenchida por um eletrão de uma sub-camada superior da mesma camada, esta transição designa-se por transição interna ou de *Coster-Kronig* [70].

Para a interpretação das transições eletrónicas entre os vários níveis atómicos é importante conhecer os diferentes rendimentos de fluorescência desses níveis, de forma a ilustrar a reorganização dos átomos ionizados num determinado nível atómico.

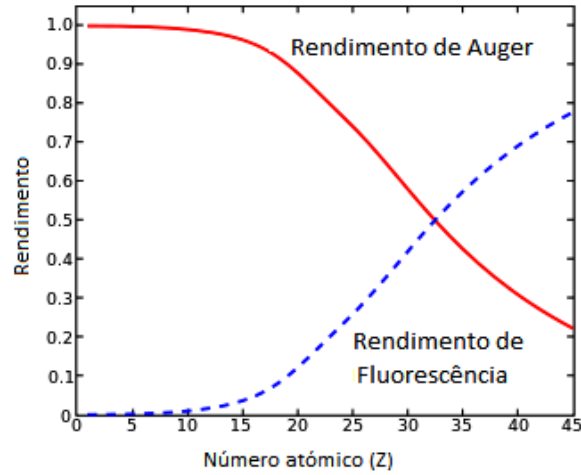


Figura 4.2: Rendimento de fluorescência e rendimento de Auger em função do número atómico. Adaptado da Ref. [71].

O rendimento de fluorescência (w), representado na Figura 4.2, é a probabilidade de uma lacuna nas camadas interiores ser preenchida por uma transição eletrónica [66], e pode ser definida como a razão entre o número de transições radiativas ou não radiativas, no mesmo intervalo de tempo, e o número de átomos ionizados nesse mesmo nível [68]. Através da análise da Figura 4.2 verifica-se que o rendimento de fluorescência é menor para elementos de baixo número atómico (Z), enquanto que o fenómeno não radiativo predomina para elementos de baixo número atómico.

4.2.2 Interação de raios-X com a matéria

Quando um feixe de raios-X interage com os átomos de uma dada substância, verifica-se uma atenuação da intensidade desse feixe, em consequência dos processos de interação da radiação com os elétrons dos átomos [68]. Estes processos dependem da energia incidente e dos átomos que constituem o meio, sendo que para energias inferiores a 1 MeV, as interações predominantes são a absorção fotoelétrica e os fenômenos de difusão (elástica e inelástica) [72].

Nestes processos a intensidade do feixe é atenuada exponencialmente em função da espessura (x) do material absorvedor, que é descrita pela lei de Lambert-Beer,

$$I_x = I_0 e^{[-(\frac{\mu}{\rho})\rho x]} \quad (4.4)$$

onde μ (cm^{-1}) é coeficiente linear de atenuação, ρ (g/cm^3) é a densidade do material, μ/ρ (cm^2/g) é o coeficiente mássico linear de atenuação, I_0 a intensidade inicial do feixe, e por fim, I_x é a intensidade transmitida pelo material absorvedor.

O coeficiente linear de atenuação depende do material e varia com a energia ou comprimento de onda de radiação, uma vez que diferentes interações predominam para diferentes energias.

Dispersão de Rayleigh

A difusão elástica ou Rayleigh é um processo de interação no qual um fóton interage com os elétrons ligados do átomo, sendo a radiação emitida difundida em todas as direções sem haver variação da energia $h\nu$. Deste modo a radiação é reemitida com a mesma energia da radiação incidente, não sendo possível a ionização ou excitação do átomo [68].

A probabilidade de ocorrência deste fenómeno é maior para baixas energias e números atômicos elevados (função de Z^2) onde os elétrons estão mais ligados [65]. A dispersão elástica não contribui para a identificação da amostra efetuada pela emissão da radiação característica e induz o aumento da linha de base [73].

Dispersão de Compton

Na difusão inelástica, também designada por dispersão de Compton um fóton interage com um elétron menos ligado do átomo, transferindo parte da sua energia. Posteriormente, o elétron escapa do átomo ou é excitado para um nível atômico não ocupado. O fóton resultante é difundido em todas as direções, com uma energia ($h\nu'$) inferior à do fóton incidente ($h\nu$).

Por conseguinte, a difusão de Compton é um processo de absorção parcial, com conservação do momento e da energia cinética, que depende da direção segundo a qual a radiação é emitida, de acordo com:

$$h\nu' = \frac{h\nu}{1 + \frac{h\nu}{m_0 c^2 (1 - \cos\theta)}} \quad (4.5)$$

onde m_0c^2 é a energia de repouso do elétron (511 keV), e θ o ângulo entre a direção da radiação incidente e a direção da radiação emitida.

A difusão inelástica torna-se mais provável com o aumento da energia da radiação incidente, ou quando a energia de ligação do elétron é desprezável face à energia do fóton incidente, sendo probabilidade desta difusão proporcional a Z [68]. Tal como na dispersão elástica, a dispersão inelástica também não contribui para a identificação da amostra e induz o aumento da linha de base [73].

Efeito Fotoelétrico

O efeito fotoelétrico é o processo de interação dominante dos raios-X com a matéria (ilustrado na Figura 4.3). Para que ocorra, é necessário que a energia do fóton incidente (E_γ), numa camada mais interna do átomo, seja igual ou superior à energia de ligação do elétron (E_l). Em efeito, a energia do fóton é absorvida e um elétron é posteriormente ejetado da sua órbita com uma energia cinética (E_c) igual à diferença entre a energia do fóton original e a energia de ligação do elétron na orbital [68].

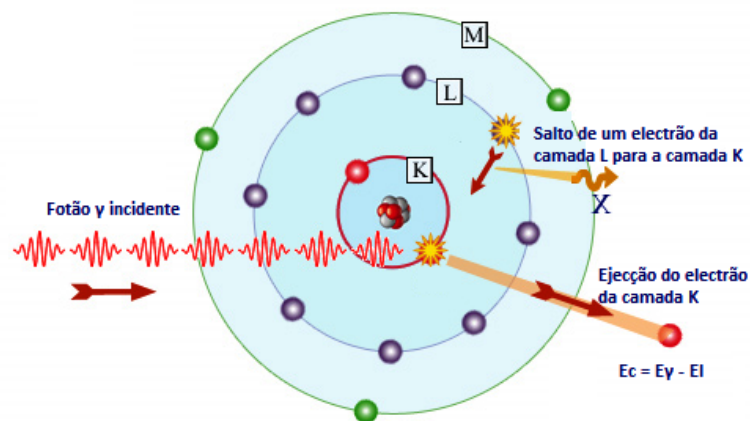


Figura 4.3: Esquema do mecanismo do efeito fotoelétrico. Adaptado da Ref. [74].

Se a energia do fóton for superior à energia de ligação, o elétron é arrancado do átomo ficando este ionizado num dado nível atômico. Ademais, a probabilidade máxima para a ocorrência do efeito fotoelétrico é quando E_γ é ligeiramente superior a E_l [68]. Além disso, este processo de interação possui efeito dominante a baixas energias ($\simeq 100$ keV) [68], e aumenta rapidamente com o número atômico (Z^4 para fótons de baixa energia e Z^5 para fótons de energia elevada) [72].

4.3 Fluorescência de raios-X dispersiva em energia

A espectroscopia de raios-X dispersiva em energia (EDXRF) fornece um meio de identificação qualitativo e quantitativo de amostras de várias formas e tamanhos, detetando tanto os constituintes principais como os elementos traço, sem que ocorra perigo de contaminações [75]. Esta é uma técnica versátil, sensível e de baixo custo que revela um elevado potencial nas mais diversas áreas [76, 77].

Principalmente utilizada para amostras sólidas, a técnica de EDXRF, permite determinar simultaneamente e sequencialmente a concentração (da vasta gama da percentagem até ao nível de $\mu\text{g/g}^{-1}$) [73] de vários elementos, sem que ocorra a destruição da amostra, isto é, sem necessidade de pré-tratamento químico [67] [78]. Ademais, a utilização de um tubo de raios-X na excitação, traduz-se numa velocidade analítica bastante elevada para análise quantitativa. Em alternativa também se utilizam fontes radioativas emissoras de raios-X e/ou gamas de baixa energia que tornam a análise mais simples e barata, mas com perda de sensibilidade analítica [67].

Contudo, este método não concede a informação estequiométrica do composto, e apresenta ainda, dificuldades na deteção elementos de baixo número atómico, o que impossibilita a identificação de componentes orgânicos [79]. O espectrómetro de raios-X dispersivo em energia consiste numa fonte de excitação, no suporte da amostra e no sistema de deteção. Neste trabalho, a fonte de excitação utilizada é um tubo de raios-X, formado por um invólucro de vácuo. Neste tubo, um cátodo aquecido é responsável pela emissão de eletrões que após serem acelerados por um forte campo elétrico, atingem o alvo ou ânodo metálico (molibdénio, prata, ouro, etc).

O sistema de deteção é constituído por um detetor de estado sólido que é utilizado para contar simultaneamente os fótons, discriminando-os de acordo com a energia. Posteriormente, os resultados (energia raios-X vs. intensidade do espectro) são armazenados num multi-canal de memória [73]. Os detetores de dispersão em energia mais utilizados são tipicamente semicondutores de alta resolução intrínseca, como os de Si (Li) [75]. Neste trabalho são utilizadas duas montagens experimentais de EDXRF, uma com geometria triaxial, e outra com um micro feixe e sistema de vácuo, para deteção de elementos leves, que são abordados com mais detalhe em 4.3.1 e 4.3.2 respetivamente.

4.3.1 Fluorescência de raios-X com geometria triaxial

O espectrómetro de geometria triaxial com um alvo secundário possibilita uma radiação quase monocromática de acordo com o elemento do alvo secundário [80]. O esquemático do espectrómetro de geometria triaxial encontra-se representado na Figura 4.4. Neste método, um tubo de raios-X (1-Figura 4.4) produz um feixe primário que irá interagir com um alvo secundário (neste caso de molibdénio, 3-Figura 4.4) a fim de produzir um feixe secundário que passa para o exterior do tubo através de uma fina janela de berílio (Be) [76]. Este feixe secundário, contém as linhas características do alvo secundário, bem como a radiação de *bremsstrahlung* que não foi eliminada por polarização [72]. O feixe secundário é colimado para a atenuar a divergência dos raios-X que incidem sobre a amostra (5-Figura 4.4) e melhorar os limites de deteção [70]. O pequeno ângulo sólido do detetor, em conjunto com a produção de uma radiação polarizada, contribui também para a diminuição da radiação detetada [80].

Neste tubo de raios-X, o alvo secundário e a amostra estão colocados em geometria triaxial, o que aumenta significativamente a sensibilidade do aparelho e reduz a radiação de fundo [70]. Assim, torna-se possível identificar os elementos traço existentes em menor concentração facilitando e oferecendo maior viabilidade na caracterização quantitativa da amostra.

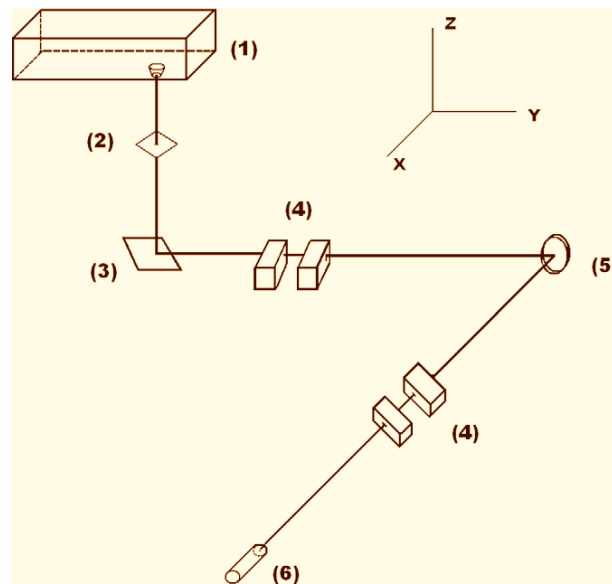


Figura 4.4: Esquema da montagem de EDXRF com geometria triaxial: (1)Tubo de raios-X, (2) Filtro de prata, (3) Alvo secundário de Mo, (4) Colimadores, (5) Amostra, (6) Detetor de Si(Li). Adaptado da Ref.[81].

Com recurso a um filtro de prata (2-Figura 4.4), colocado entre o feixe primário e o alvo secundário, que absorve a radiação de baixas energias do *bremsstrahlung* do tubo, bem como a utilização de dois colimadores (4-Figura 4.4) de prata é possível reduzir a radiação de fundo e melhorar os limites de detecção [81, 77]. O detetor utilizado corresponde a um detetor semiconductor de Si (Li) (6-Figura 4.4), com melhor resolução em energia [65]. Neste detetor a gama de energias é aplicável entre 1 a 50 keV [72].

No espectro de raios-X, a região de mais baixa energia está relacionada com os efeitos de escape do detetor. A região de energia mais elevada corresponde à região de ocorrência dos fenómenos de difusão (Compton e Rayleigh) do alvo secundário. Por sua vez, a região intermédia contém as linhas K e L características da amostra, que se pretende analisar [72].

4.3.2 Micro-Fluorescência de raios-X com geometria convencional

O espectrómetro de micro-fluorescência de raios-X (μ -XRF) utilizado neste trabalho consistiu num espectrómetro comercial, o M4 Tornado da Bruker [63]. O tubo de raios-X é de baixa potência e equipado com um sistema de refrigeração por ar. No tubo de raios-X microfocalizado, os eletrões são gerados por um filamento aquecido, normalmente de W [63]. Estes eletrões são acelerados desde o cátodo, polarizado com tensão negativa, contra o ânodo (Rh), antes de entrar no cilindro de focalização do tubo [79].

Normalmente, o material alvo consiste num disco fino de tungsténio num invólucro sólido de cobre, que permite a dissipação de calor para longe do alvo [63]. Atualmente, são comercializados tubos microfocalizados com material alvo de Cu, Mo, Rh e W [79], sendo neste caso utilizado o alvo de Mo.

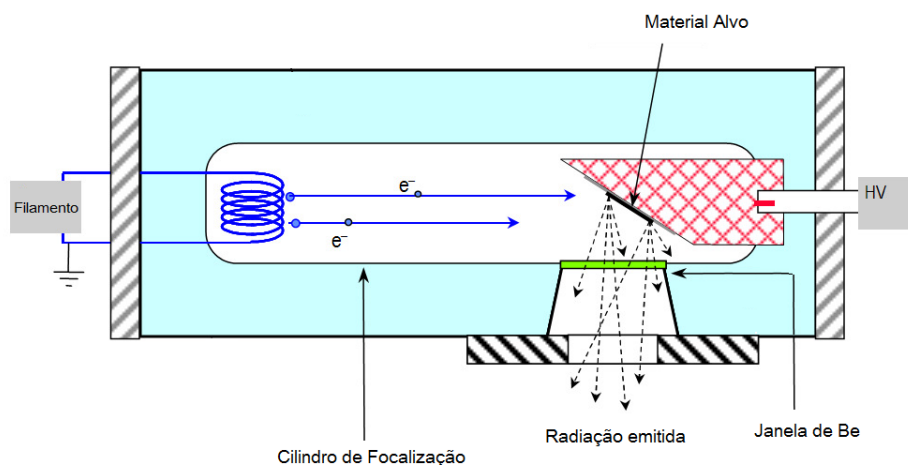


Figura 4.5: Esquema do tubo com geometria *side-window*. Adaptado da Ref. [63].

Por fim, os raios-X gerados pelo alvo passam para o exterior do tubo, através de uma fina janela de Be, que minimiza a absorção dos raios-X de baixas energias [79]. A direção do feixe de saída é dependente da geometria *side-window* do tubo [63], em que a janela de saída dos raios-X é perpendicular ao eixo do tubo [79]. Esta geometria (ver Figura 4.5) limita o ângulo sólido da radiação que vem do tubo, o que possibilita uma melhor definição do foco, em que os electrões são concentrados numa área muito reduzida, permitindo uma fonte de radiação com elevada intensidade [63].

As lentes policapilares utilizadas para focar o feixe (Figura 4.6a) consistem numa matriz com um grande número de pequenos tubos ocos de vidro (capilares). Este é um tipo de ótica de reflexão total, em que os raios-X que saem da fonte com um grande ângulo sólido são transmitidos, mediante múltiplas reflexões totais dentro dos capilares, resultando num feixe focalizado [79]. Para que um fóton se propague ao longo do capilar por múltiplas reflexões, o ângulo que incide sobre a superfície do vidro do mesmo (θ_i) deve ser menor que o ângulo crítico (θ_c), sendo que quanto menor for θ_i maior será a probabilidade de propagação [70]. Por outro lado, se o fóton apresenta um ângulo de incidência maior que o ângulo crítico é atenuado nas paredes do policapilar [79], conforme demonstrado na Figura 4.6b.

A deteção da radiação de fluorescência é realizada utilizando um detetor arrefecido termoelettricamente de Silício (SDD do acrónimo em inglês *Silicon-Drift-Detector*) que converte a radiação emitida pela amostra num espectro digital [63].

No espectro, os raios-X caraterísticos aparecem como picos gaussianos de uma largura específica. A formação destes picos deve-se às flutuações estatísticas do número de pares eletrão-lacuna que se formam quando um fóton de uma certa energia entra no detetor [79]. Para além disso, existem outros artefactos que contribuem para a má interpretação dos espectros, como os pico soma, os picos de escape e coleção incompleta de carga [79].

Os picos de escape são picos que aparecem à esquerda de um pico intenso, correspondente às linhas K e L de um constituinte maioritário da amostra [79]. Nos detetores de Si, o pico de escape terá a energia do pico original menos 1,74 keV [70]. Isto porque, se a excitação do átomo Si ocorrer perto da superfície, é provável que os raios-X caraterístico escape e a quantidade correspondente de energia é perdida do sinal [70].

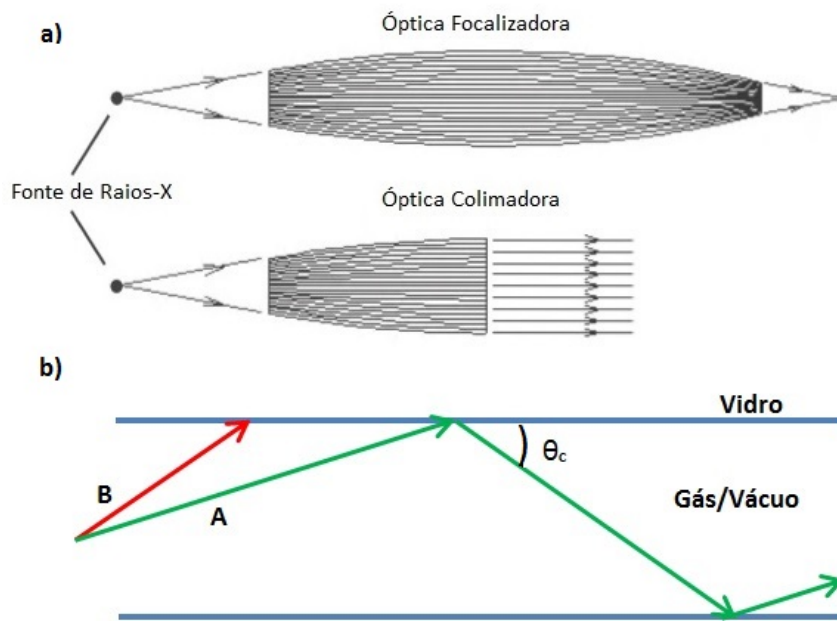


Figura 4.6: Esquema da ótica policapilar. a) Esquema de sistemas óticos de focalização e colimação. Adaptado da Ref.[82]. b) Condições de reflexão total para os raios-X incidentes no capilar de vidro. O fotão A, com $\theta_i < \theta_c$ propaga-se ao longo do capilar; o fotão B com $\theta_i > \theta_c$ é atenuado nas paredes do capilar.

Relativamente aos picos de soma, estes aparecem pela incapacidade dos aparelhos eletrónicos de separar impulsos coincidentes no tempo. Deste modo, o resultado é um pico cuja energia é a soma das energias de ambos os impulsos [79].

Por fim, a coleção incompleta de carga ocorre quando o sinal de carga medido é menor do que o esperado, e consequentemente a energia medida é mais baixa que a energia dos raios-X incidentes, resultando numa “cauda” no lado de mais baixa energia do pico no espetro [70]. A técnica de μ -XRF utilizada neste trabalho permite realizar medições em condições de vácuo, o que possibilita a deteção de elementos de baixo Z [83], sendo que a radiação de baixa energia entre a amostra e o detetor não é absorvida pelo ar [63]. O uso deste equipamento permite ainda realizar mapeamento químico da amostra (*mapping*) de modo a verificar a sua homogeneidade [63].

Capítulo 5

Materiais e Métodos

5.1 Descrição das amostras

A Ermida do Espírito Santo em Almada (Portugal), foi construída no século XV, e de acordo com os registos da paróquia de Santa Maria do Castelo, terá servido como local de sepultamento entre 1755 e meados do século XIX [1]. No decurso de uma escavação arqueológica realizada entre 2010 e 2011 foram exumados os restos mortais de 83 indivíduos [2]. Este conjunto de esqueletos foi recuperado de um solo muito ácido localizado perto do rio Tejo. Sobre o local de sepultamento foi posteriormente construído um sistema de canalização em chumbo.

Neste trabalho, foram analisados ossos, dentes, cabelo e massas encefálicas de 15 indivíduos, encontrados entre 34 a 96 cm da superfície. Para avaliar possíveis contaminações do local de sepultamento foram analisados os solos das áreas correspondentes. A planta da EES, representada na figura 5.1, apresenta o local de inumação dos indivíduos em estudo que são retratados por números. Deste modo, verifica-se que os indivíduos 10, 11, 54 e 83 foram sepultados na área 2; os indivíduos 4, 6, 7 e 8 na área 3; os indivíduos 14, 15 e 17 na área 4, e por fim, os indivíduos 31, 32 e 37 na área 5. Apenas o indivíduo 1 não foi encontrado sob terra, mas antes sob pedra.

5.2 Análise em EDXRF com geometria triaxial

O espectrómetro com geometria triaxial utilizado neste trabalho consiste num tubo de raios-X (Phillips) equipado com um alvo secundário de Mo [8]. Esta geometria possibilita a obtenção de uma fonte aproximadamente monocromática com linhas K_{α} e K_{β} de Mo, de energias 17,44 e 19,60 keV respetivamente [32]. A radiação característica emitida é detetada por um detetor de silício ativado com lítio, Si (Li), da Oxford Instruments (Inglaterra). O detetor apresenta uma janela de berílio de 8 μm e área de 30 mm², com uma energia de resolução de 135 eV a 5,9 keV [84]. Os dados são armazenados num computador onde está instalado um sistema de aquisição Nucleus PCA. O aparelho foi operado a 50 kV e 20 mA com um tempo de aquisição típico de 1000 s.

O cabelo foi analisado em madeixa, tal como recomendado por Török [85] a fim de minimizar efeitos de heterogeneidade. As amostras de cabelo foram divididas com a ajuda de uma pinça de modo a se obter madeixas de 5 a 10 mm de diâmetro. Relativamente à massa encefálica, cada amostra foi cortada com o auxílio de uma pinça e um bisturi em secções de 10 a 15 mm de diâmetro. Tanto as amostras de cabelo como as amostras de massa encefálica não foram lavadas visto que são as únicas amostras da espécie de toda a coleção, e por isso valiosas para o museu. Por fim, as amostras de cabelo e de massa encefálica colocaram-se num suporte 50x50 mm, coladas a uma película *Mylar*, que foi posicionada diante do feixe de raios-X.

5.2.2 Quantificação

Para o EDXRF com geometria triaxial os cálculos quantitativos foram realizados segundo o método dos parâmetros fundamentais [86]. Após a obtenção do espectro é possível determinar a concentração dos elementos presentes na amostra. Em primeiro lugar determina-se a intensidade, I_i , de um pico característico de um elemento i . Para isso, identifica-se cada elemento fazendo corresponder a energia dos picos observados no espectro com a energia dos valores tabelados. De seguida, determina-se o integral da área (número total de contagens) correspondente a cada pico, após extração da linha de base. A relação entre intensidade e a concentração do elemento i na amostra, C_i ($\mu\text{g/g}$), é conseguida pela aplicação da seguinte expressão:

$$I_i = I_0 K_i A_i m C_i \quad (5.1)$$

onde I_0 é a intensidade inicial da radiação, K_i o fator de calibração experimental, A_i o fator de atenuação, e m a massa superficial da amostra (g/cm^2) [37]. O fator de atenuação determina a atenuação do feixe de radiação que atravessa a amostra, sendo dado por:

$$A_i = \frac{1 - e^{-\alpha_i}}{\alpha_i} \quad (5.2)$$

sendo:

$$\alpha_i = \sum C_j \left[\frac{\mu(E_{(0,j)})}{\sin\theta_1} + \frac{\mu(E_{(i,j)})}{\sin\theta_2} \right] m \quad (5.3)$$

onde:

$\mu(E_{(0,j)})$ é o coeficiente de atenuação para o elemento j para a energia E_0 do fóton;

$\mu(E_{(i,j)})$ é o coeficiente de atenuação para o elemento j , para a energia E_i do fóton;

E_i é a energia da radiação característica do elemento i ;

E_0 é a energia da radiação incidente;

θ_1 é o ângulo da radiação incidente;

θ_2 é o ângulo da radiação emitida pela amostra.

Devido à atenuação do detetor a radiação de raios-X de baixa energia não pode ser detetada e os elementos leves não podem ser determinados. Contudo, nas amostras biológicas estes elementos constituem a maior parte da matriz, e por isso serão muito significativos para o fator de atenuação. Relativamente ao fator de calibração experimental, este é dado por,

$$K_i = \Omega \varepsilon_i C'_i \omega_i \sigma_i P_{(n-m)} \quad (5.4)$$

onde, Ω é o ângulo sólido do detetor, ε_i a eficiência, C'_i é a absorção da radiação na janela do detetor e no ar, ω_i é o rendimento de fluorescência, σ_i , é a secção eficaz de ionização, e por fim, $P_{(n-m)}$ corresponde à probabilidade de transição do nível n para o nível m , do elemento i .

A calibração do detetor é realizada com base em materiais de referência (SRM do acrónimo do inglês *Standard Reference Materials*), tendo sido neste caso utilizados: Orchard Leaves – standard 1571 [87] para a massa encefálica; o cabelo humano enriquecido de metilmercúrio IAEA-085 (Agência Internacional de Energia Atómica)[88] e DC73347 (Centro de Análises Nacionais da China para ferro e aço) [89] para o cabelo; Bone Ash SRM NIST-1400 [90] e Bovine Bone NYS RM 05-02 [91] para o osso; e por último o IAEA – soil 7 [92] e International Soil-Analytical Exchange – ISE- 954 [93] para o solo.

5.3 Análise em μ -EDXRF

Na análise em μ -EDXRF, o aparelho utilizado foi um espectrómetro comercial, o M4 Tornado da Bruker (Alemanha). O tubo de raios-X é microfocalizado com uma janela lateral de Rh, alimentado por um gerador de baixa potência e arrefecido por ar. Apresenta uma lente policapilar que permite obter um tamanho focal de 25 μ m para Mo- K_α . O gerador de raios-X foi operado a 50 keV e 300 μ A, sendo também utilizada uma composição de filtros para reduzir a radiação de baixa energia proveniente do tubo (100 μ m Al/ 50 μ m Ti/ 25 μ m Cu). Para a deteção de radiação de fluorescência foi utilizado um SDD arrefecido termoelectricamente (efeito Peltier), com uma resolução em energia de 142 eV para Mn- K_α . As medições foram efetuadas em condições de vácuo, a 20 mbar.

5.3.1 Preparação de amostras

Na análise em μ -EDXRF, foram analisados 15 dentes e 22 ossos. Cada amostra de osso foi lavada em água corrente e cuidadosamente escovada para remover qualquer contaminação do solo, sendo cortados com uma espessura de 0,05 cm. Para além deste processo de limpeza, os ossos sujeitos a mapeamentos foram ainda lavados com água ultra pura, secos num ambiente limpo à temperatura ambiente e armazenados sob condições de humidade adequadas. Os mesmos foram cortados com um micrótopo com serra de diamante (Buehler), para evitar contaminação na superfície de corte, com uma espessura aproximada de 1 mm. Posteriormente, as amostras foram coladas numa caixa de petri com o auxílio de uma fita de carbono.

Os dentes foram cortados em cortes transversais longitudinais usando um micrótomo com serra de diamante (*Buehler*), de acordo com o descrito por Carvalho *et al.* [9]. As medições por pontos e os mapeamentos elementares foram realizados diretamente sobre a amostra, que foi colocada numa caixa de petri com fita de carbono. Para todas as espécies, as medições por pontos e os mapeamentos elementares foram realizados diretamente sobre a amostra.

5.3.2 Quantificação

A avaliação quantitativa para o μ -EDXRF teve por base o método comparativo, em que é utilizado um conjunto de SRM. Este método, bem como a desconvolução e ajuste do espectro foram executados com o software de análise de raios-X WinAxil (Camberra, Bélgica) [94].

A avaliação do espectro baseia-se na construção de um modelo matemático, em que o analista tenta descrever os dados experimentais, efetuando antes do ajuste uma calibração manual. Ou seja, a região do espectro em que se aplica o ajuste deve ser especificada pelo analista que seleciona os picos de raios-X que devem ser incluídos no modelo, e identifica os parâmetros das condições de medição (resolução, energia, corrente, etc) do espectrómetro. O WinFund, que pertence ao WinAxil, efetua os cálculos das concentrações elementares, a partir das áreas dos picos desconvoluídos, utilizando a aproximação do método comparativo. A Figura 5.2 apresenta o ajuste do espectro do fémur do indivíduo 8 efetuado no software de análise de raios-X Winaxil.

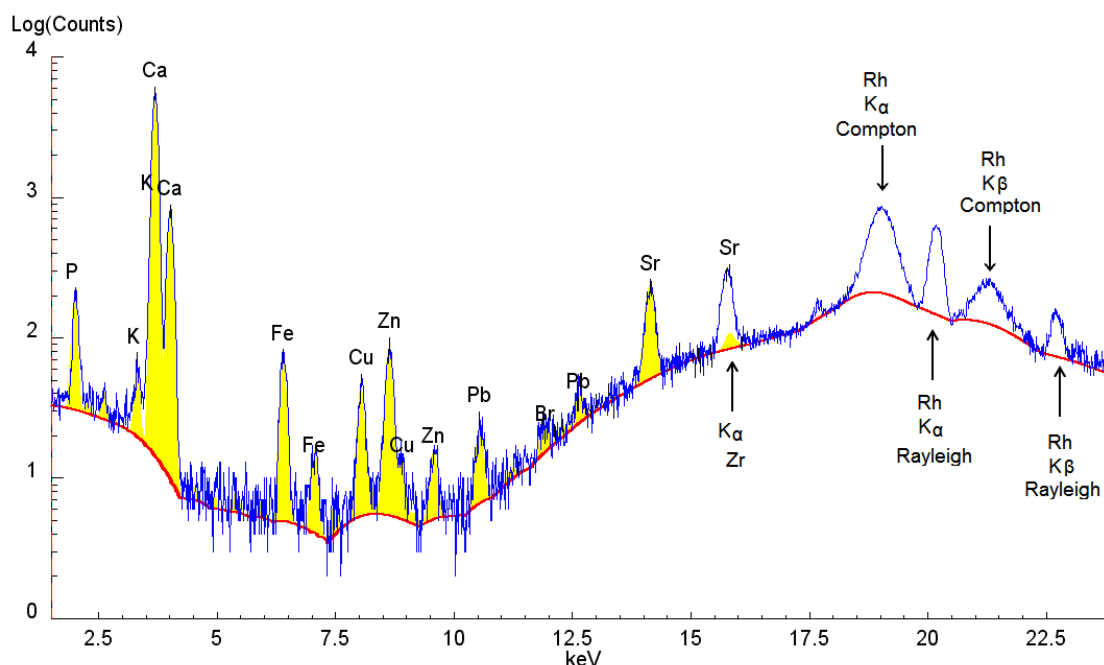


Figura 5.2: Ajuste do espectro do fémur do indivíduo 8 realizado no Software de análise de raios-X WinAxil. Na figura o pico K_{α} do Zr advém do equipamento. A região de energia mais elevada é a dos picos de dispersão de Compton e Rayleigh. A maior intensidade dos picos de Compton em comparação com o de Rayleigh é devida à composição da amostra ser maioritariamente constituída de elementos leves, como C, H e O.

Para a quantificação do solo foi criado um ficheiro de calibração com 2 SRM: IAEA – soil 7 e International Soil-Analytical Exchange – ISE- 954. Na quantificação de ossos e dentes os SRM do ficheiro de calibração foram o Bone Ash SRM NIST-1400 e o Bovine Bone NYS RM 05-02.

5.4 Limites de Detecção e Exatidão

Para uma dada técnica, o limite de detecção (LD) é a menor concentração de uma substância, neste caso um elemento químico, que pode ser detetada numa amostra, mas não necessariamente quantificada [37]. Os LD dependem inversamente dos tempos de contagem e diretamente da intensidade da radiação de fundo [72]. Estes são determinados utilizando SRM com concentrações conhecidas da substância em estudo. Os limites de detecção para a EDXRF foram calculados com base na seguinte expressão:

$$LD = \left(\frac{3c_i\sqrt{n_B}}{n_p} \right) \quad (5.5)$$

onde c_i é a concentração do elemento i , n_B é a taxa de contagem para o fundo, e n_p é a taxa de contagem para o pico correspondente [95].

Para este trabalho foram calculados os LD obtidos com o espectrómetro de geometria triaxial e com o M4 Tornado, bem como a exatidão do método proposto de quantificação para ambos os equipamentos. As tabelas de 5.1 a 5.3 apresentam alguns desses cálculos, sendo que os restantes podem ser consultados nas tabelas A1 a A4 do Apêndice A.

Tabela 5.1: Comparação das concentrações ($\mu\text{g/g}$) de IAEA-085, DC73347 e Orchard Leaves obtidas no presente trabalho e os respetivos valores certificados.

	IAEA-085		DC73347		Orchard Leaves	
	Obtido	Certificado	Obtido	Certificado	Obtido	Certificado
P					2300 ± 500	2100 ± 100
K					1600 ± 1000	14700 ± 300
S			50000 ± 5000	43000±3000	1800 ± 600	1900
Cl					550 ± 50	690
Ca	850± 80	929±81	2200±400	2900±300	20000± 1000	20900±300
Mn	10±1	8,8 ± 0,4	6 ± 1	6,3 ± 0,8	100± 10	91± 4
Fe	77±6	79,3 ±8,4	56±10	54±10	310±20	300±20
Cu	18±1	16,8 ±0,9	15± 5	10,6±0,2	14±2	12 ± 1
Zn	155±10	163±7	210±20	190±9	25± 3	25±3
Sr						37*
Hg	21±2	23,2 ±0,8				0,155±0,015
Pb			10± 1	8,8±1,1	45±2	45± 3

* Valor não Certificado.

A exatidão é medida por comparação do resultado analítico com o valor certificado. A equivalência estatística entre os valores estimados e observados pode ser usada para confirmar a qualidade da medição [96].

Ao comparar os valores indicados nas tabelas 5.2 pode afirmar-se que o método de quantificação, bem como os SRM selecionados, são adequados à investigação dos vários elementos traço existentes nas espécies biológicas deste trabalho. Neste trabalho, o ficheiro de calibração responsável por quantificar ossos e dentes foi utilizado para quantificar o SRM Caprine Bone 05-04. Deste modo, comprovou-se a validade do método de quantificação dos dados obtidos pelo μ -EDXRF, pela concordância dos valores tabelados com os valores obtidos.

Tabela 5.2: Comparação das concentrações ($\mu\text{g/g}$) de Bovine Bone 05-02 e Bone Ash SRM NIST-1400 com o SRM Caprine Bone 05-04, obtidas no presente trabalho e os respetivos valores certificados.

	Bovine Bone Obtido	Bone Ash Obtido	Caprine Bone Obtido	Caprine Bone Certificado
P	140000 \pm 30000	140000 \pm 30000	130000 \pm 30000	125000
Ca	300000 \pm 70000	300000 \pm 70000	290000 \pm 70000	264000
Mn				1,6
Fe		400 \pm 300	7 \pm 4	2,9
Zn	90 \pm 20	160 \pm 30	70 \pm 10	81
Sr	170 \pm 10	240 \pm 10	150 \pm 9	150
Pb	15 \pm 9	7 \pm 3	30 \pm 20	31,5 \pm 0,7

Tabela 5.3: Limites de deteção e exatidão ($\mu\text{g/g}$) no μ -EDXRF para o IAEA – soil 7.

	IAEA - soil 7		
	LD	Obtido	Certificado
Si	15000 \pm 1000	230000 \pm 90000	180000 \pm 1100
K	710 \pm 50	13000 \pm 7000	12100 \pm 800
Ca	380 \pm 20	160000 \pm 60000	163000 \pm 60000
Ti	200 \pm 30	2500 \pm 1000	3000 \pm 400
Mn	33 \pm 3	500 \pm 200	631 \pm 27
Fe	28 \pm 1	25000 \pm 9000	25700 \pm 500
Ni	12 \pm 2	29 \pm 9	26 \pm 5
Cu	5 \pm 1	15 \pm 7	11 \pm 2
Zn	7 \pm 1	110 \pm 40	104 \pm 3
Rb	6 \pm 1	60 \pm 20	51 \pm 4
Sr	8 \pm 1	130 \pm 50	108 \pm 5
Pb	5 \pm 1	50 \pm 20	60 \pm 5

Capítulo 6

Resultados e Discussão

Este capítulo apresenta os resultados obtidos com as duas montagens experimentais utilizadas, e seus distintos métodos analíticos de quantificação. Numa primeira fase da investigação as amostras dos tecidos (exceto os dentes) foram medidas por EDXRF com geometria triaxial. Neste estudo, os resultados obtidos mais significativos foram as concentrações anormalmente elevadas de Hg numa amostra de cabelo do indivíduo 31, e concentrações muito elevadas de Pb na costela do indivíduo 54. Face a estes resultados, resolveu-se analisar com especial atenção estes dois indivíduos. Deste modo, o estudo destes indivíduos é apresentado em separado dos restantes na secção 6.2 e 6.3, respetivamente. Os resultados obtidos para o conjunto dos indivíduos da EES, em estudo, são apresentados na secção 6.1.

6.1 Caso Geral

Os processos naturais da diagénese alteram a composição *ante-mortem* do osso. As águas subterrâneas e o solo podem ser responsáveis por incorporar elementos contaminantes na matriz do osso. Deste modo, é importante conhecer as características do local de sepultamento. Os indivíduos da EES foram sepultados todos no mesmo período, entre 1755 e 1833 [2]. No entanto, os indivíduos referentes ao estudo deste trabalho foram inumados em áreas diferentes. O solo correspondente de cada área pode apresentar propriedades químicas diferentes. Estas diferenças devem-se principalmente à posterior introdução de um sistema de canalização (ver Figura 5.1). Assim, as amostras dos solos, correspondentes à área de sepultamento de cada indivíduo, foram analisadas por μ -EDXRF. Os resultados obtidos revelaram concentrações elevadas de Fe, Cu e Pb no solo da área 4 (Figura 6.1). Revelou-se ainda uma diferença significativa entre essas concentrações e as dos restantes solos. Deste modo, torna-se importante interpretar as diferenças, de maneira a compreender como os indivíduos foram afetados pelas mesmas.

Na Figura 6.1 apresentam-se as concentrações obtidas por μ -EDXRF para as amostras de solo. O solo da área 4 destaca-se pela concentração elevada de Fe, Cu e Pb (1800 $\mu\text{g/g}$, 700 $\mu\text{g/g}$ e 1400 $\mu\text{g/g}$, respetivamente), em comparação com as concentrações dos restantes solos. Ao observar a Figura 5.1, verifica-se que a maior parte do sistema de canalização foi construído sob a área 4. Este sistema de canalização engloba uma canalização em Pb, e uma outra canalização destinada ao esgoto.

Ambos os sistemas de canalização seriam responsáveis pela introdução de contaminantes no solo que podem justificar as diferenças dos níveis de Fe, Cu e Pb entre a área 4 e as restantes áreas.

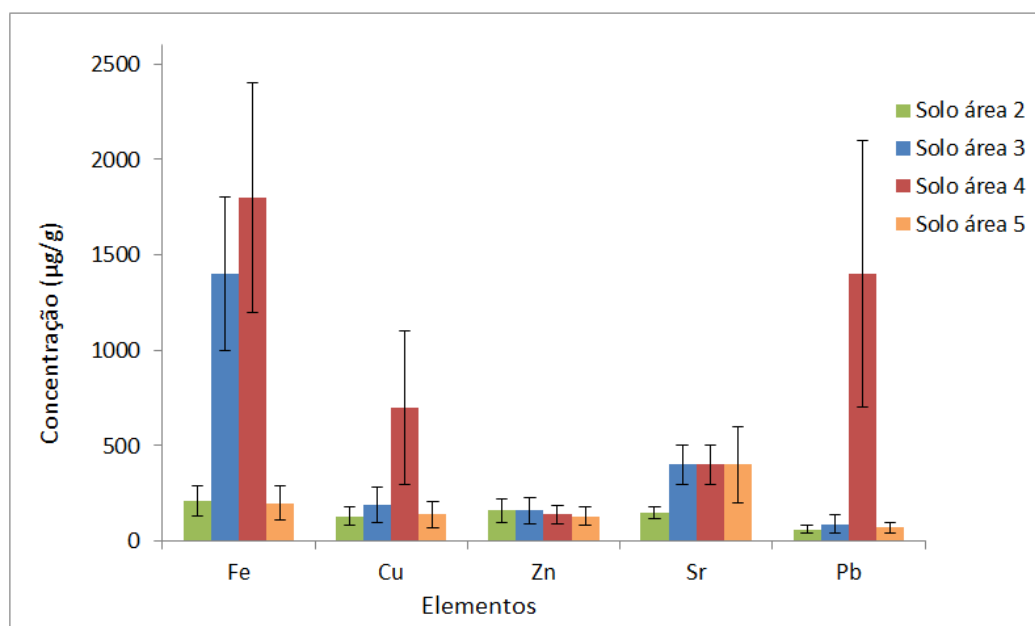


Figura 6.1: Concentrações das amostras de solo ($\mu\text{g/g}$) obtidas por $\mu\text{-EDXRF}$. Solo área 2: indivíduo 10,11, 54 e 83; Solo área 3: indivíduo 4, 6, 7 e 8; Solo área 4: indivíduo 14, 15 e 17; Solo área 5: indivíduo 31, 32 e 37.

O solo da área 3 também apresenta uma concentração elevada de Fe ($1400 \mu\text{g/g}$), embora menor do que a apresentada pelo solo da área 4. Na Figura 5.1, denota-se que para além da área 4, os sistemas de canalização também foram construídos sob a área 3. Deste modo, deduz-se que, os sistemas de canalização, principalmente o do esgoto, foram responsáveis pela concentração elevada de Fe. Não existem dados sobre o tipo de metal que constitui a canalização do esgoto. Todavia, pelos dados obtidos, tanto no solo 4 como no solo 3, é possível que a canalização do esgoto seja em ferro.

6.1.1 Ossos

Os elevados níveis de Fe, Cu e Pb presentes no solo de área 4, podem ter alterado a composição elementar dos indivíduos sepultados nesta área. Deste modo, considerou-se interessante estudar os indivíduos inumados na área 4 (indivíduo 14, 15 e 17). O osso é um bom indicador das alterações físicas e químicas que podem ocorrer durante o período de inumação. Deste modo, determinaram-se as concentrações de Fe, Cu e Pb nas costelas dos indivíduos sepultados na área 4 (Figura 6.2). De entre estes resultados, o mais significativo foi a concentração elevada de Fe na costela do indivíduo 17.

De seguida, pretendeu-se comparar as concentrações elementares obtidas pelos diferentes indivíduos. A Figura 6.3 apresenta os resultados obtidos por EDXRF com geometria triaxial. Neste caso foram escolhidos 4 indivíduos representativos do trabalho. Esta análise revelou diferenças entre as concentrações do mesmo elemento em indivíduos diferentes. Por isso, considerou-se pertinente avaliar o perfil do Ca, Sr, Zn e Pb nos ossos, para todos os indivíduos. Este estudo foi realizado com os dados obtidos por $\mu\text{-EDXRF}$, sendo apresentado na Figura 6.4.

Na análise das concentrações elementares obtidas por μ -EDXRF, optou-se por não considerar as concentrações de Fe e Cu. Esta decisão deveu-se à disparidade considerável verificada entre as concentrações de Fe e Cu pelas duas técnicas, e ainda pela grande incerteza associada destes elementos na técnica de μ -EDXRF.

A Figura 6.2 exibe as concentrações das costelas, por EDXRF com geometria triaxial, do Fe, Cu e Pb dos indivíduos pertencentes à área 4. Os indivíduos sepultados nesta área foram o 14, o 15 e o 17. Considerou-se que esta área apresenta as condições mais propícias para contaminar o osso. As costelas são um osso esponjoso, e por isso a sua morfologia altamente porosa torna-o mais suscetível à alteração *post-mortem* do que o osso compacto. Deste modo, e para aferir se ocorreu contaminação *post-mortem*, optou-se por analisar as costelas dos 3 indivíduos (Figura 6.2).

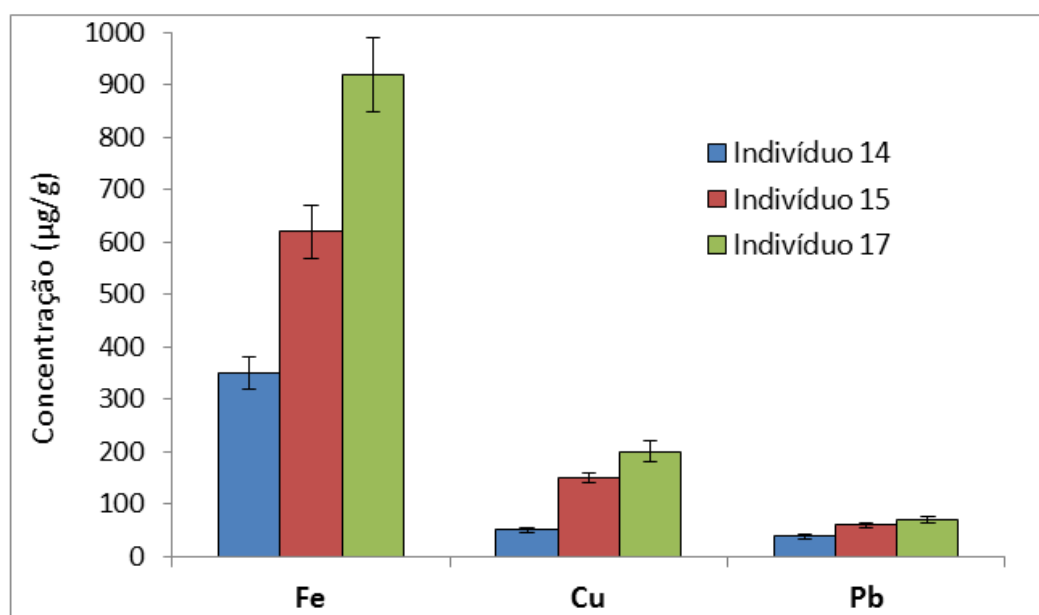


Figura 6.2: Concentrações de Fe, Cu e Pb nas costelas ($\mu\text{g/g}$) de indivíduos sepultados na área 4. Medições efetuadas por EDXRF com geometria triaxial.

Tabela 6.1: Concentrações de elementos traço ($\mu\text{g/g}$) em ossos humanos de indivíduos do século XX [97], e concentração do elemento cálcio ($\mu\text{g/g}$), em ossos humanos, retirada da literatura [98].

	Ca ($\mu\text{g/g}$)	Fe ($\mu\text{g/g}$)	Cu ($\mu\text{g/g}$)	Zn ($\mu\text{g/g}$)	Sr ($\mu\text{g/g}$)	Pb ($\mu\text{g/g}$)
Referência [97]	-	153 ± 265	$4,9 \pm 0,6$	172 ± 26	147 ± 55	25 ± 17
Referência [98]	340000	-	-	-	-	-

Ao observar a Figura 6.2 denota-se uma disparidade considerável entre as concentrações de Fe dos 3 indivíduos. O indivíduo 14 apresenta a menor concentração de Fe dos 3 indivíduos. Além disso, o nível de Fe deste indivíduo ($350 \mu\text{g/g}$) está dentro do valor apresentado na Tabela 6.1 para cidadãos do século XX. Deste modo, é plausível que não tenha ocorrido contaminação significativa de Fe pelo solo. O indivíduo 15 apresenta uma concentração de Fe cerca de duas vezes superior ($620 \mu\text{g/g}$) à apresentada pelo indivíduo 14. Neste caso a probabilidade de contaminação *post-mortem* é reforçada.

Em relação ao indivíduo 17, este apresenta uma concentração de Fe aproximadamente 3 vezes superior ($920 \mu\text{g/g}$) à apresentada pelo indivíduo 14. Os 3 indivíduos referidos estiveram sujeitos às mesmas condições após sepultamento. Por isso, em caso de contaminação deveriam ser observados resultados congruentes. Como tal não foi observado, a contaminação *post-mortem* não é muito provável, e caso tenha ocorrido foi pouco significativa. A hipótese mais provável é que a concentração elevada de Fe, principalmente no indivíduo 17, seja indicativa da acumulação *in vivo*. Todavia, não existem dados suficientes para encontrar uma causa que justifique este resultado. Deste modo, seria interessante aprofundar o estudo deste indivíduo num trabalho futuro.

O elemento Cu encontrado nas costelas também apresenta diferenças entre os 3 indivíduos. Porém, estas diferenças não são tão significativas como as encontradas para o Fe. A contaminação *post-mortem* é aceitável neste caso. As concentrações de Pb para os três indivíduos são da mesma ordem de grandeza. Além disso, os níveis de Pb observados nas costelas dos indivíduos são superiores às dos cidadãos do século XX (Tabela 6.1). Assim, é possível que tenha ocorrido contaminação de Pb pelo solo, para as costelas dos indivíduos 14, 15 e 17.

Para a técnica de μ -EDXRF analisam-se fatias de osso, com uma espessura de 0,05 cm, e no caso da EDXRF com geometria triaxial analisam-se pastilhas, o que contribui para a heterogeneidade na análise das amostras, em ambas as técnicas. Por outro lado, a amostra de tecido analisada pelas duas técnicas não é exatamente a mesma, apesar de pertencer ao mesmo tecido. Na figura 6.3 apresentam-se os resultados obtidos por EDXRF com geometria triaxial, para ossos diferentes de quatro indivíduos. Estes quatro indivíduos foram considerados representativos do conjunto.

Após a observação dos gráficos e) e d) da Figura 6.3 pode concluir-se que o Ca e o Sr são os elementos, cujos valores de concentração obtidos, apresentam maior semelhança entre os vários indivíduos. As concentrações obtidas para estes dois elementos com a técnica de EDXRF com geometria triaxial estão dentro dos valores tabelados (ver Tabela 6.1). Relativamente ao elemento Zn (Figura 6.3f), a maior parte dos indivíduos apresentam concentrações que estão dentro do intervalo de valores apresentado na Tabela 6.1. Contudo, existem indivíduos, como é o caso do indivíduo 37, onde se observam altos níveis deste elemento.

Os níveis de Cu, Fe e Pb apresentam um comportamento variável de indivíduo para indivíduo (Figura 6.3a, 6.3b e 6.3c). As concentrações de Cu (Figura 6.3a) e Pb (Figura 6.3b) são elevadas para a maioria dos indivíduos estudados. Todavia estes metais podem ter sido introduzidos como contaminantes através do solo. O Fe é o elemento que apresenta a maior disparidade entre todos os indivíduos, sendo que em alguns se verificam concentrações coincidentes com os valores da Tabela 6.1 (exemplo do indivíduo 37 da Figura 6.3c). Por outro lado, também foi observado que em alguns indivíduos, como é o caso do indivíduo 15, foram obtidas concentrações bastante elevadas para este elemento.

Na Figura 6.4 são evidenciados os perfis elementares para o Ca, Zn, Sr e Pb, para vários tipos de osso pertencentes a indivíduos diferentes, obtidos por μ -EDXRF. É notório o enriquecimento de Zn (gráfico c) em ossos de pelo menos 7 indivíduos (indivíduo 10, 6, 11, 15, 17, 83 e 32), quando se compara com os valores da literatura (Tabela 6.1). As concentrações de Zn nos solos (Figura 6.1) não sugerem que este elemento seja um contaminante introduzido *post-mortem* na matriz do osso. Deste modo, este elemento pode ser representativo das condições *ante-mortem* do osso, e um meio de concluir sobre a quantidade de proteína animal e certos vegetais consumidos durante o período de vida.

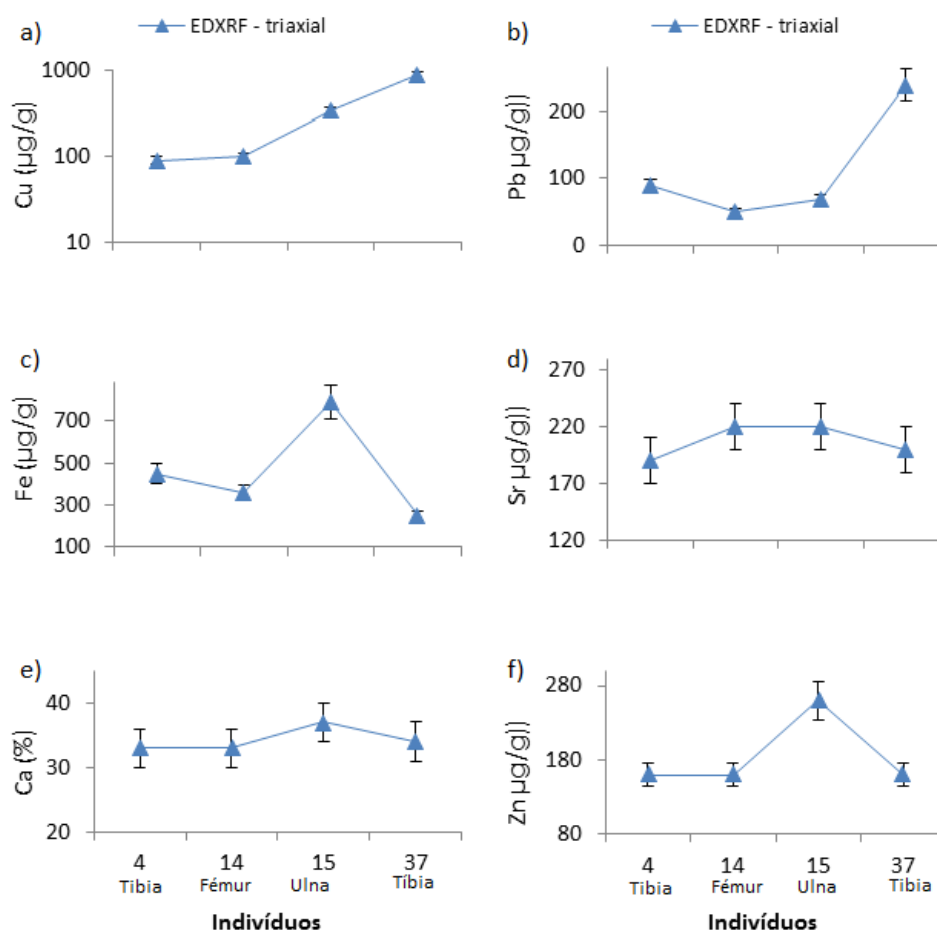


Figura 6.3: Comparação entre as concentrações obtidas ($\mu\text{g/g}$) para os indivíduos 4, 14, 15 e 37, por EDXRF com geometria triaxial. a) Gráfico relativo às concentrações do elemento Cu ($\mu\text{g/g}$); b) Gráfico relativo às concentrações do elemento Pb ($\mu\text{g/g}$); c) Gráfico relativo às concentrações do elemento Fe ($\mu\text{g/g}$); d) Gráfico relativo às concentrações do elemento Sr ($\mu\text{g/g}$); e) Gráfico relativo às concentrações do elemento Ca (%); e) Gráfico relativo às concentrações do elemento Zn ($\mu\text{g/g}$).

O perfil de Sr (Figura 6.4b) no osso é semelhante na maioria dos indivíduos, e corresponde aos valores encontrados em cidadãos do século XX (Tabela 6.1). Deste modo, o Sr demonstrou ter permanecido inalterado durante o sepultamento. Estes valores podem ser associados à dieta, especialmente ao consumo de proteína de origem marítima. Apenas os indivíduos 10, 15 e 32 apresentam concentrações superiores. A concentração de estrôncio no solo onde o indivíduo 10 foi sepultado (Figura 6.1) é inferior à observada na Figura 6.4b. Contudo, para os indivíduos 15 e 32 a concentração de Sr encontrada no local de sepultamento está dentro dos valores medidos os ossos (ulna e rádio respetivamente) destes indivíduos.

Relativamente ao chumbo, a maioria dos indivíduos apresentam concentrações acima das apresentadas pela literatura para cidadãos do século XX (Tabela 6.1). No entanto, ao comparar os níveis de Pb no osso com os do solo (Figura 6.1), é possível que este elemento tenha sido introduzido como contaminante pelo solo do local de sepultamento.

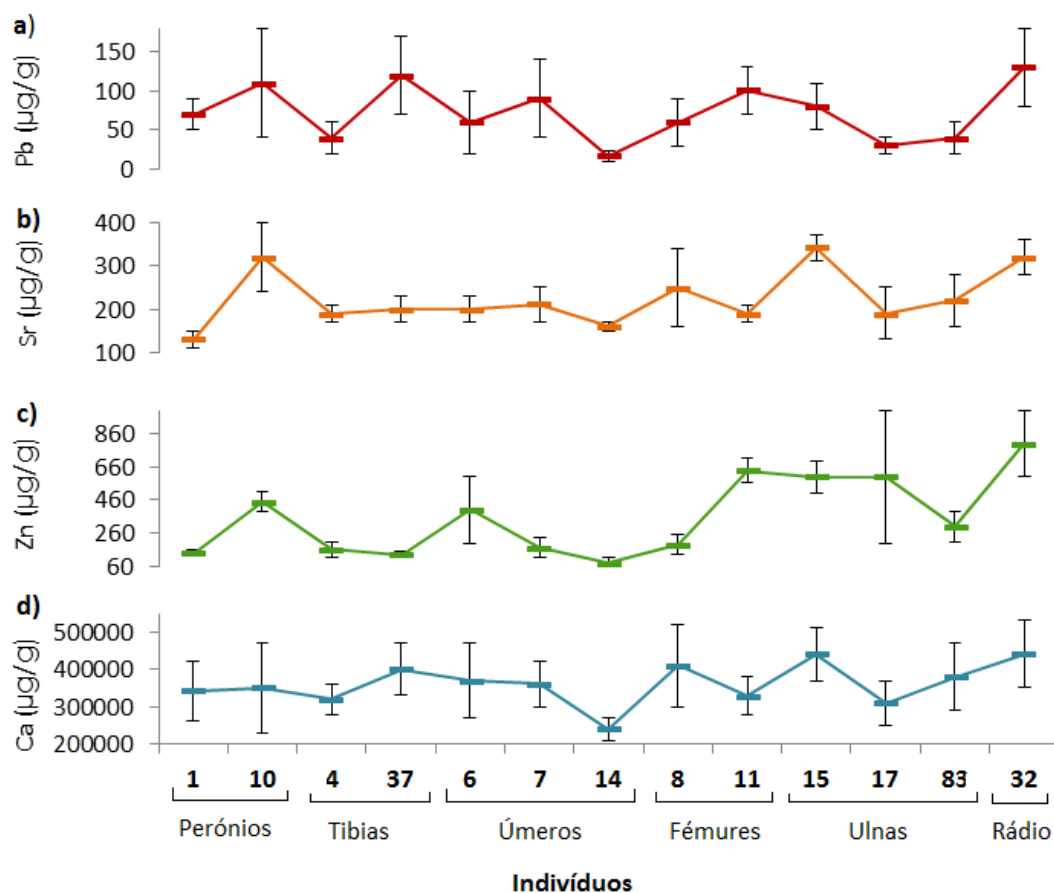


Figura 6.4: Comparação entre os ossos medidos no μ -EDXRF para todos os indivíduos (excetuando os indivíduos 54 e 31). a) Gráfico relativo às concentrações do elemento Pb ($\mu\text{g/g}$); b) Gráfico relativo às concentrações do elemento Sr ($\mu\text{g/g}$); c) Gráfico relativo às concentrações do elemento Zn ($\mu\text{g/g}$); d) Gráfico relativo às concentrações do elemento Ca ($\mu\text{g/g}$).

6.1.2 Dentes

Os dentes foram analisados em fatia, pelo aparelho de μ -EDXRF. Em cada fatia do dente foi possível medir o esmalte, a dentina, a polpa e a raiz. Deste modo, estudou-se a distribuição dos elementos ao longo do dente. As concentrações elementares médias em $\mu\text{g/g}$, para o Ca, Zn, Sr e Pb ao longo do dente, de 4 indivíduos considerados representativos do conjunto, encontram-se apresentadas na Figura 6.5.

A Figura 6.5a, exemplifica a distribuição de Sr ao longo do dente, que apresenta caráter variável de indivíduo para indivíduo. A concentração calculada deste elemento foi elevada. Contudo observando os resultados obtidos para todos os dentes, não foi possível estabelecer uma relação entre a concentração do elemento e a região do dente.

Relativamente ao cálcio, os seus níveis no esmalte e na dentina estavam em acordo com os encontrados na literatura. Observou-se que a concentração de cálcio no esmalte foi sempre superior

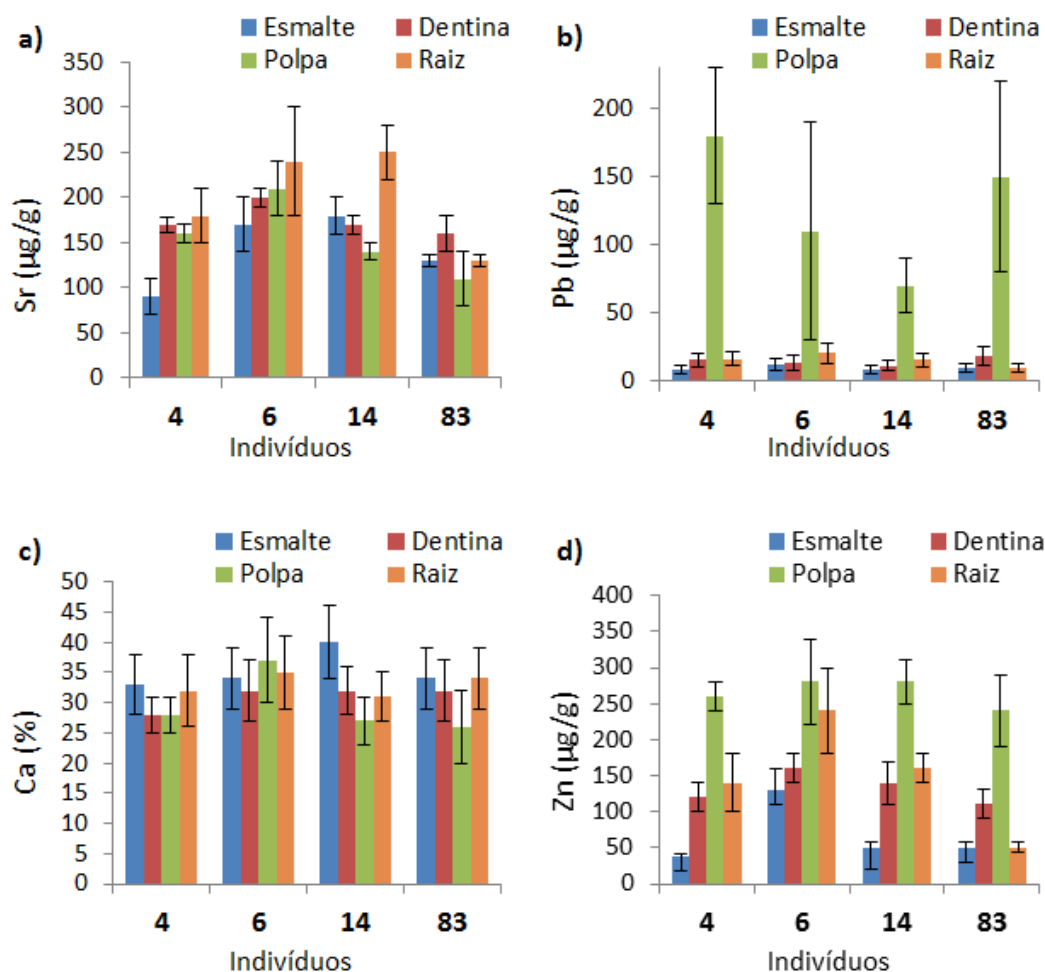


Figura 6.5: Concentrações elementares ($\mu\text{g/g}$) ao longo do dente para os indivíduos 4, 6, 14 e 83. a) Gráfico relativo às concentrações do elemento Sr ($\mu\text{g/g}$); b) Gráfico relativo às concentrações do elemento Pb ($\mu\text{g/g}$); c) Gráfico relativo às concentrações do elemento Ca (%); d) Gráfico relativo às concentrações do elemento Zn ($\mu\text{g/g}$); Medições efetuadas por μ -EDXRF.

à concentração de cálcio na dentina, o que está de acordo com dados referenciados na literatura [98]. A polpa apresentou para a maioria dos dentes a menor concentração de Ca, porém houve algumas exceções como a observada no dente do indivíduo 6 (Figura 6.5c).

O resultado mais relevante foi para o elemento Pb, sendo que se verificou que na maioria dos dentes as concentrações mais elevadas foram observadas na polpa. Nestes casos, como exemplificado na Figura 6.5b, notou-se uma diferença acentuada entre a concentração de Pb na polpa e nas restantes regiões.

Ademais, demonstrou-se ainda que o esmalte apresentou a menor concentração de Pb, em todos os dentes, sendo que em alguns casos esta concentração era pouco significativa. A concentração de Pb em dentes sepultados reflete tanto a acumulação *post-mortem* como *in-vivo*, sendo possível a distinção através do estudo da distribuição, ao longo das regiões de acumulação. O Pb na parte interna do dente corresponde à acumulação *ante-mortem*, e o Pb nas regiões externas é maioritariamente associado à captação *post-mortem* a partir do local de inumação [9].

Os níveis mais elevados de zinco foram encontrados na polpa, para a maioria dos dentes, sendo seguida da raiz. Alguns investigadores já confirmaram que os fumadores apresentam níveis mais elevados de Pb e Zn [7] do que não fumadores. Deste modo, as concentrações elevadas de Pb e Zn na polpa podem ser um indicativo de que alguns dos indivíduos eram fumadores. Por último, as menores concentrações de Zn foram observadas no esmalte. Esta conclusão foi comum para os restantes indivíduos.

6.1.3 Cabelo e Massa Encefálica

Na Figura 6.6 e 6.7 são apresentadas as concentrações médias ($\mu\text{g/g}$) das amostras de cabelo e das amostras de massa encefálica, respetivamente. É de referir que a massa encefálica do indivíduo 54 e o cabelo do indivíduo 31 não são incluídos neste estudo, sendo abordados na secção 6.2 e 6.3 respetivamente.

No aparelho de EDXRF com geometria triaxial foram analisadas madeixas de cabelo para todos os indivíduos, excluindo o indivíduo 6, que só possuía alguns fios de cabelo para análise. Talvez por isso, apenas para a amostra de cabelo do indivíduo 6, não foram detetados os elementos S e Pb. Relativamente aos restantes indivíduos, foi encontrada uma concentração elevada de enxofre nas amostras de cabelo (Figura 6.6). O S é um elemento maioritário constituinte do cabelo, como se pode ver no SRM DC73347 da Tabela 5.1, e como demonstrado na Figura 6.6. Contudo as concentrações obtidas de S para os indivíduos em estudo são aproximadamente metade do valor certificado.

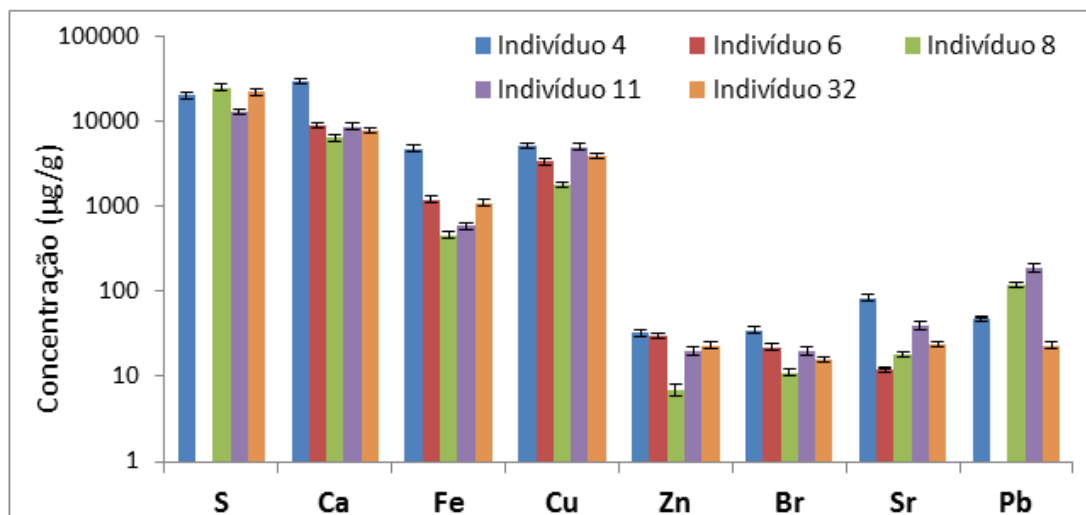


Figura 6.6: Concentrações elementais ($\mu\text{g/g}$) das amostras de cabelo para o indivíduo 4, 6, 8, 11 e 32. Medições efetuadas por EDXRF com geometria triaxial.

Ademais, as concentrações de Ca observadas na Figura 6.6 foram elevadas quando se considera que, segundo dados da literatura, o valor típico de Ca na constituição do cabelo é de 0,3 % (w/w) [26]. Além disso, também foi encontrada uma quantidade significativa de Fe e Cu, em todos os cabelos. Apenas as amostras de cabelo dos indivíduos 8 e 11 revelaram uma concentração elevada de chumbo. A concentração elevada destes metais (Ca, Fe, Cu e Pb) pode ser justificada por contaminação *in-vivo*,

através da água utilizada na lavagem do cabelo, e também por contaminação *post-mortem*, através de águas subterrâneas. A água da torneira pode conter muitos elementos, nomeadamente cálcio e cobre [26]. O Pb também pode advir da canalização, que no século XVIII-XIX tinha este metal como elemento maioritário na sua constituição.

Não se verificaram diferenças significativas em relação à concentração do elemento Br. Salienta-se que através do espectro de raios-X foi possível detetar Se, contudo não foi possível quantificá-lo.

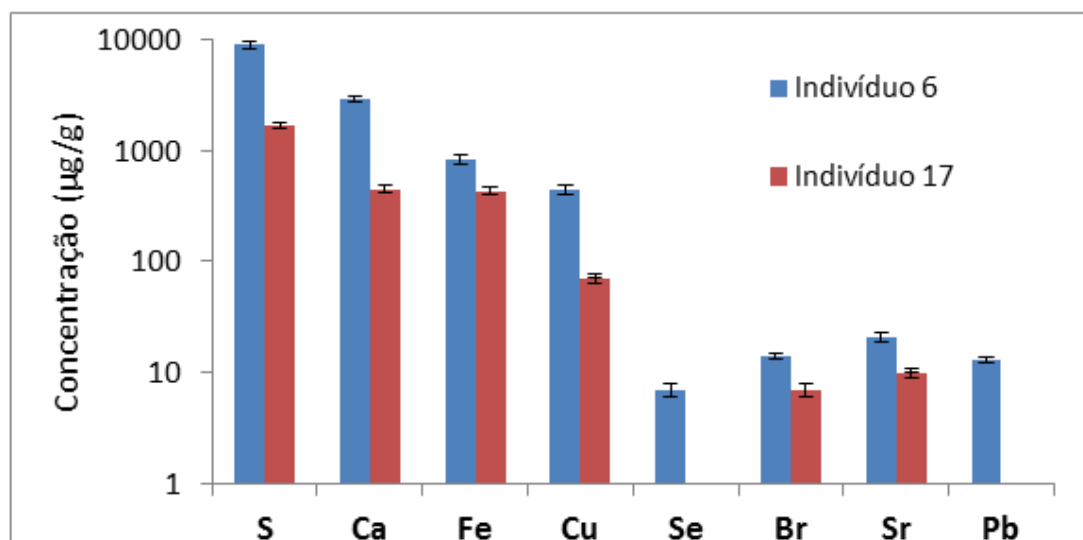


Figura 6.7: Concentrações elementares ($\mu\text{g/g}$) das amostras de massa encefálica para o indivíduo 6 e 17. Medições efetuadas por EDXRF com geometria triaxial.

Nas amostras de massa encefálica do indivíduo 6 e do indivíduo 17 foram observadas concentrações elevadas de S, Ca, Fe e Cu (Figura 6.7). Como a massa encefálica é um tecido muito esponjoso, é provável que os níveis elevados de Ca, Fe e Cu tenham sido introduzidos no tecido como contaminantes do solo do local de sepultamento. Para além disso, as amostras de massa encefálica não se encontravam num bom estado de preservação. Apenas na massa encefálica do indivíduo 6 foram encontrados os elementos Se e Pb. Porém as concentrações destes elementos são muito baixas. Por fim, também uma baixa concentração de Br e Sr (Figura 6.7) foi encontrada na massa encefálica dos dois indivíduos.

6.2 Caso especial do indivíduo 31

O resultado mais significativo obtido neste estudo foi a concentração elevada de mercúrio (Hg) em amostras de cabelo, até 6% (w/w), Figura 6.8. Relativamente a esta concentração elevada de Hg, torna-se importante compreender se a captação deste elemento ocorreu *in vivo* ou *post-mortem*.

No que diz respeito ao indivíduo 31, sabe-se que este era do sexo feminino e que teria mais de 50 anos na altura do seu falecimento.

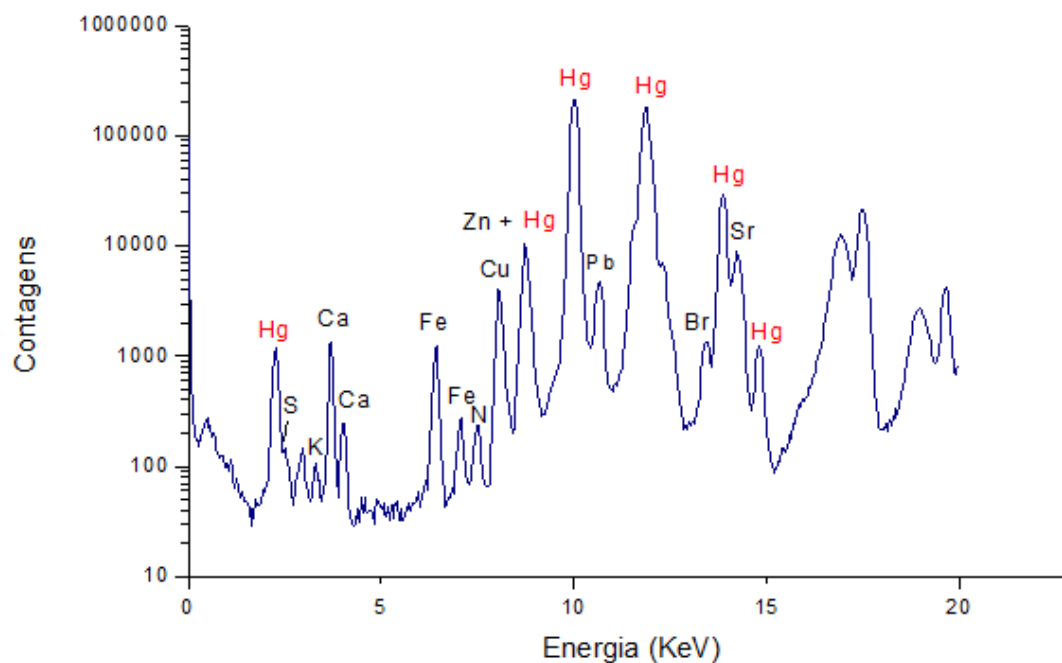


Figura 6.8: Espectro de EDXRF com geometria triaxial obtido para o cabelo do indivíduo 31.

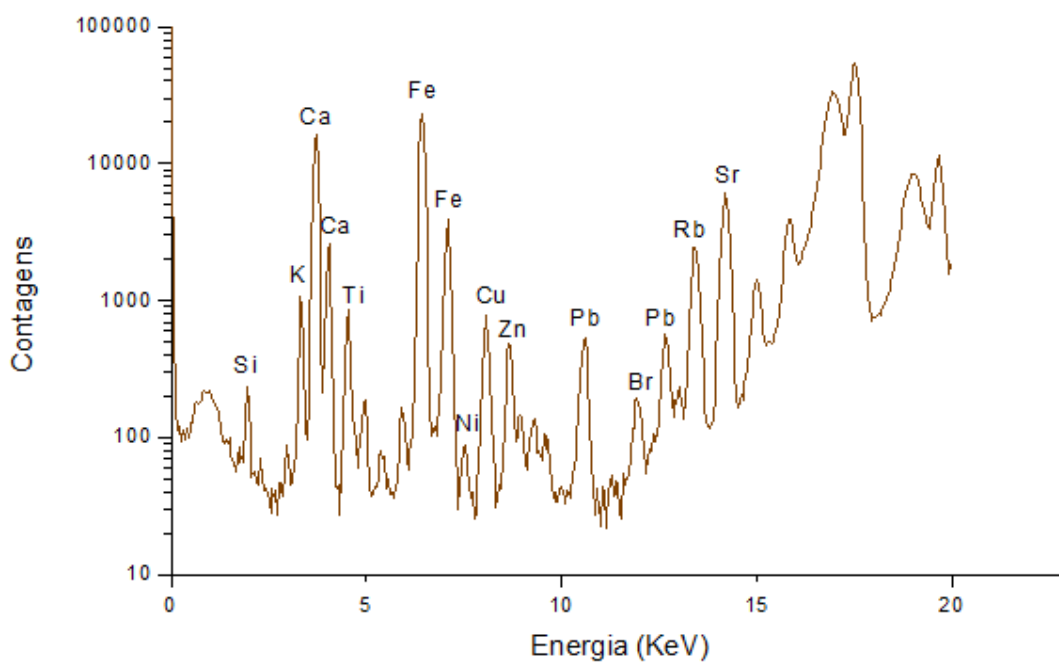


Figura 6.9: Espectro de EDXRF com geometria triaxial obtido para o solo (área 5) retirado do local de sepultamento do indivíduo 31.

O espectro de EDXRF obtido para o solo (solo de área 5) retirado do local de sepultamento, está representado na Figura 6.9. Neste espectro não é visível nenhum pico de Hg. Para este equipamento não foi possível calcular o Limite de Detecção para o Hg em amostras de solo. No entanto o LD para

o Pb é $5 \mu\text{g/g}$ (Tabela 5.3), e por isso o limite para o Hg seria da mesma ordem de magnitude. Deste modo, não existe Hg no solo, ou a sua presença é de ng/g de ordem de magnitude, o que significa que a possibilidade de contaminação a partir do local de sepultamento é muito improvável.

Todavia, ainda não é possível concluir se a contaminação por Hg foi causada por uma fonte externa ou interna. Assim, todos os tecidos disponíveis do indivíduo 31 foram analisados para compreender se o Hg está localizado apenas no cabelo ou se está presente noutros órgãos. A Figura 6.10 apresenta as avaliações quantitativas das amostras de osso do indivíduo em estudo. O único osso que apresentou Hg foi o crânio, numa concentração significativamente mais baixa ($40 \mu\text{g/g}$) que a do cabelo, porém ainda representativa.

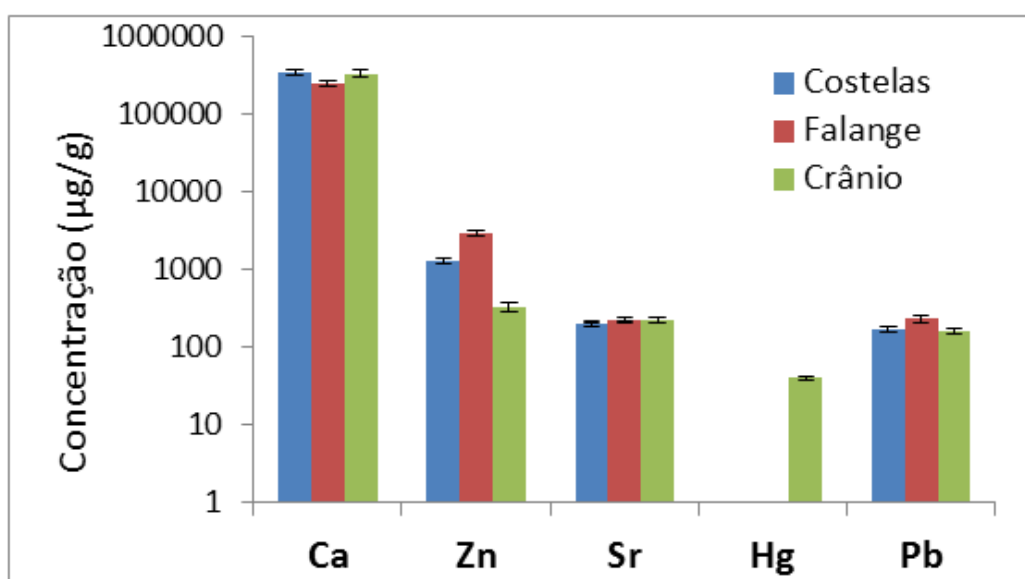


Figura 6.10: Gráfico relativo às avaliações quantitativas ($\mu\text{g/g}$) das amostras de osso do indivíduo 31.

O mapeamento elementar obtido para uma fatia do dente não revelou a presença de Hg em nenhuma região do dente, tanto na parte interna como na parte externa. Todavia, observou-se a presença do elemento Pb em grandes quantidades, na região interna do dente, mais precisamente na polpa e na raiz. Estes dados estão de acordo com os discutidos na secção 6.1.2 deste capítulo.

Considerando os dados obtidos, a concentração muito elevada de Hg no cabelo do indivíduo 31 pode apenas ser explicada por uma exposição externa, e não pela ingestão de Hg. Deste modo, a hipótese mais provável é que a fonte de mercúrio tenha sido aplicada diretamente no cabelo. Esta hipótese também explicaria o Hg encontrado numa quantidade menor no crânio.

Sabe-se que algum mercúrio inorgânico pode penetrar no organismo através da pele, mas apenas uma pequena quantidade é absorvida quando comparada com a quantidade que entra no organismo através da ingestão [99]. A principal explicação para a aplicação de Hg pode ser o seu uso para o tratamento da pediculose (desinfestação de piolhos) [100].

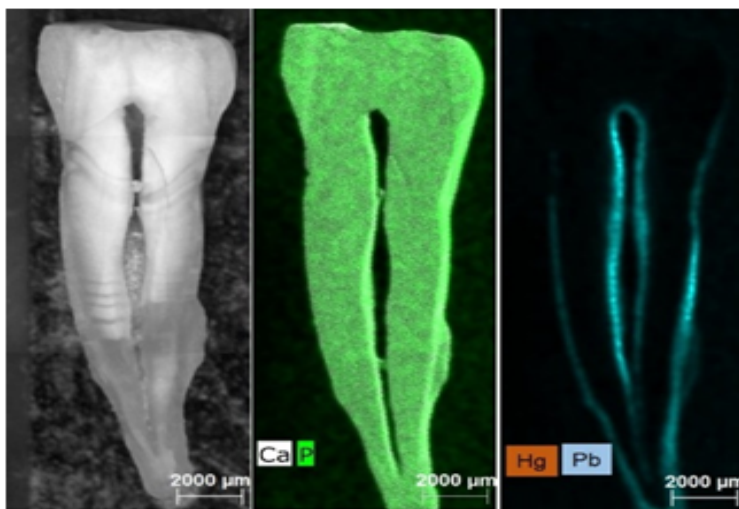


Figura 6.11: Mapeamento elementar obtido para uma fatia do dente 31.

De acordo com G. Fornaciari *et al.*, as amostras de cabelo do rei Ferdinand II (1467-1496) revelaram uma concentração elevada de Hg, de cerca de $827 \mu\text{g/g}$, determinada por *Atomic Absorption Spectrometry* (AAS) [100]. Durante o período da Renascença, o mercúrio era frequentemente usado em receitas de cosmética, no tratamento da doença de Hansen, para remover eritemas ou outras doenças de pele [100, 101].

Ademais, outros elementos foram encontrados em concentrações mais elevadas nas amostras de cabelo, como o S, Cu, Br e o Sr. Como referido na secção 6.3, o enxofre é um elemento maioritário constituinte do cabelo, porém a sua concentração acima dos 10 % (w/w) pode indicar o uso de mercúrio na forma de ácido sulfúrico. Para além disso, os restantes elementos também podem ter sido afetados pela aplicação do medicamento contra piolhos.

6.3 Caso especial do indivíduo 54

Os resultados obtidos evidenciaram níveis especialmente elevados de Pb nas costelas ($560 \mu\text{g/g}$) e na massa encefálica ($740 \mu\text{g/g}$). No que diz respeito a estes valores torna-se importante compreender se a captação deste elemento teve origem *post-mortem* ou *in vivo*. Sabe-se que a mobilidade do Pb, do solo para o osso é especialmente elevada em solos ácidos [20], sendo que o solo da EES possui essa característica.

Na Figura 6.12, está representada a sobreposição dos espetros do solo (solo área 2) e das costelas do indivíduo 54, obtidos por EDXRF. Apesar de no primeiro espetro ser visível o pico de Pb, denota-se que para o segundo espetro a intensidade do pico é maior. De facto, concentração de Pb obtida pelo aparelho de $\mu\text{-EDXRF}$ para o solo da área 2 (Figura 6.1) é de $50 \mu\text{g/g}$. Assim, é pouco provável que a elevada quantidade de Pb presente nos tecidos do indivíduo 54 seja devida apenas a uma contaminação *post-mortem*. Além disso, a área em que o indivíduo 54 foi sepultado (área 2) não tinha o sistema de canalização em chumbo instalado (ver Figura 5.1). Considera-se portanto que o Pb presente no solo não foi o único contributo na contaminação, e por isso torna-se importante descobrir que outra fonte interna/externa terá estado envolvida na mesma.

Deste modo, todos os tecidos disponíveis do indivíduo 54 foram analisados, por forma a compreender se os níveis elevados de Pb se mantinham elevados em todos os órgãos.

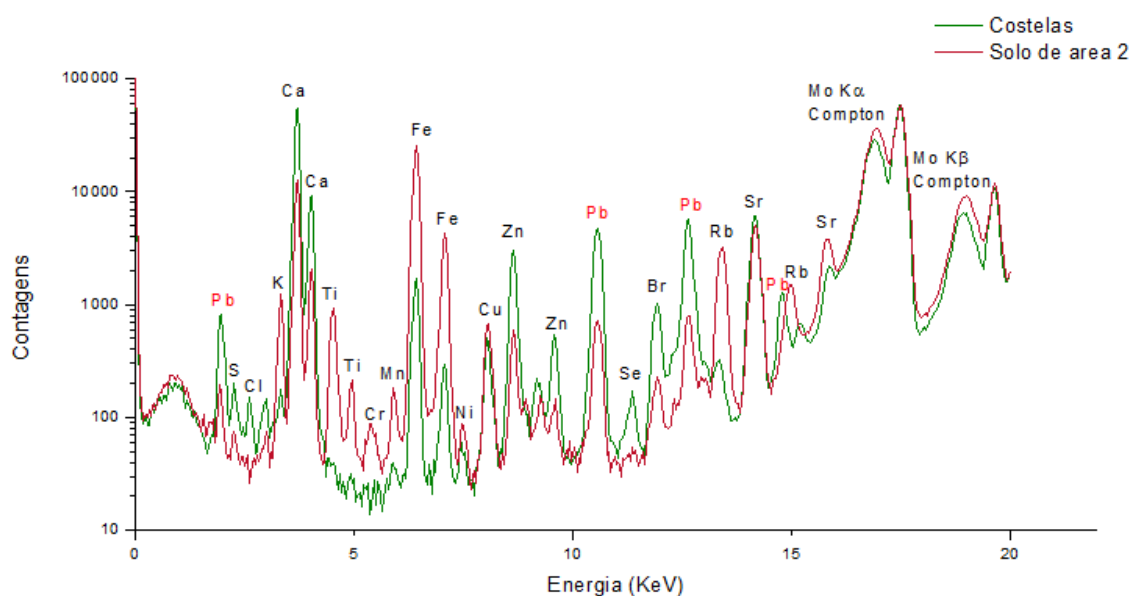


Figura 6.12: Espectro de EDXRF com geometria triaxial obtido para as costelas do indivíduo 54 e para o solo do local de sepultamento (área 2).

Na Figura 6.13 são apresentadas as concentrações ($\mu\text{g/g}$) de Pb das amostras de osso do indivíduo em estudo, obtidas por EDXRF com geometria triaxial. Para a tíbia e o perónio foi possível medir tanto a região compacta do osso como a região esponjosa.

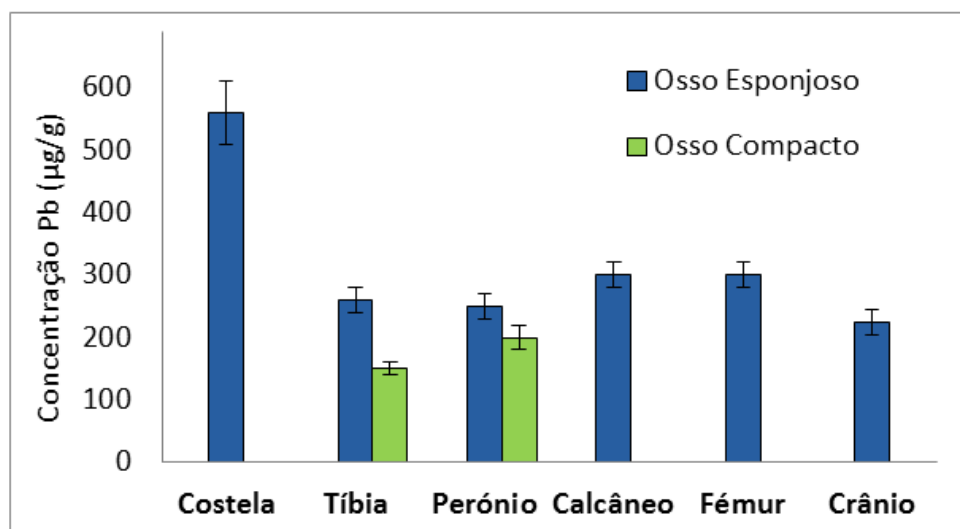


Figura 6.13: Gráfico relativo às avaliações quantitativas ($\mu\text{g/g}$) das amostras de osso do indivíduo 54.

A partir da Figura 6.13, verifica-se que todos os ossos, especialmente os ossos esponjosos, apresentam níveis de Pb extremamente elevados. Apesar de o osso compacto apresentar concentrações de Pb inferiores às do osso esponjoso, esses valores continuam a ser anormalmente elevados para este elemento, e podem indicar a captação *ante-mortem*. A elevada porosidade do osso esponjoso e a sua morfologia dispersa tornam-no mais suscetível à alteração *post-mortem* do que o osso compacto [20, 102].

Através da técnica de μ -EDXRF, verificou-se novamente que o osso esponjoso apresenta uma concentração de Pb mais elevada que o osso compacto. Na Figura 6.14, foram medidos 10 pontos ao longo de uma fatia da tíbia pelo M4 Tornado, da parte externa (região compacta) para a parte interna (região esponjosa). Denota-se assim, o aumento progressivo deste metal pesado ao longo do osso.

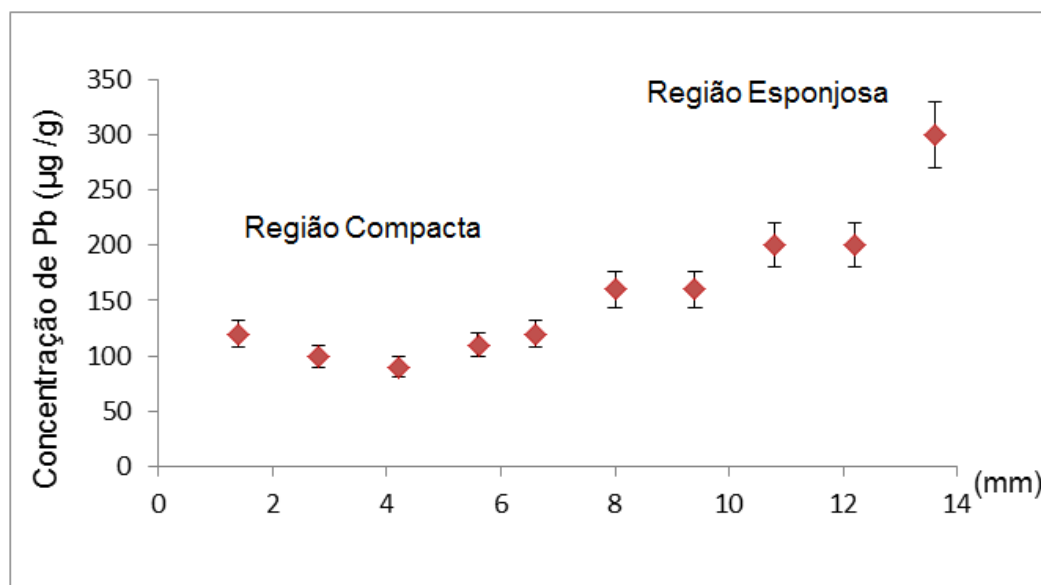


Figura 6.14: Gráfico relativo às avaliações quantitativas ($\mu\text{g/g}$) de Pb ao longo de uma fatia de tíbia do indivíduo 54. Medições obtidas através do aparelho de μ -EDXRF.

O mapeamento elementar obtido para uma fatia do dente revelou uma concentração elevada de Pb na parte interna do dente, mais precisamente na polpa e na raiz (Figura 6.15). Os dentes são normalmente considerados como menos suscetíveis às alterações *post-mortem* [20]. O chumbo acumula-se preferencialmente na parte interna do dente reflete a acumulação *ante-mortem* associada a condições ambientais e hábitos alimentares [9]. Ao observar os valores quantitativos de Pb no dente, a polpa destaca-se com uma concentração de $400 \mu\text{g/g}$, seguida da raiz com $150 \mu\text{g/g}$ de Pb (Figura 6.16).

Deste modo, considerando os dados obtidos, a concentração muito elevada de Pb nos tecidos do indivíduo 54, pode ser explicada por uma exposição externa. Os processos de fundição e refinaria de chumbo são os que provavelmente representam maior risco de exposição, e por isso são a hipótese mais provável para a fonte de Pb. A produção industrial trouxe um aumento significativo na ingestão de Pb através dos alimentos [56, 55]. Observou-se que as fundições operacionais foram responsáveis pela contaminação das populações vizinhas [57] e dos seus trabalhadores [58, 59]. L. Gerhardsson *et al.* [58] determinou as concentrações de Pb em trabalhadores de fundição reformados, sendo que a maior concentração encontrada entre os trabalhadores foi de $106 \mu\text{g/g}$ para uma falange da mão.

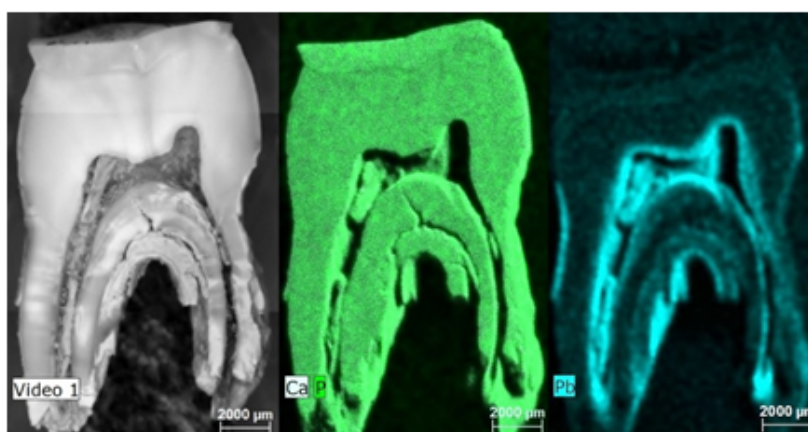


Figura 6.15: Mapeamento elementar obtido para uma fatia do dente 54.

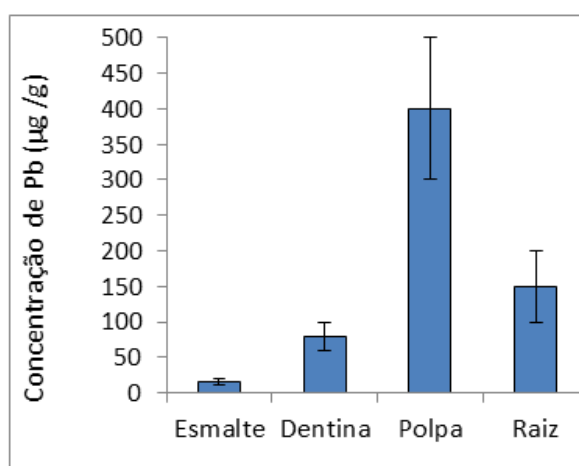


Figura 6.16: Gráfico relativo às avaliações quantitativas ($\mu\text{g/g}$) de Pb ao longo do dente do indivíduo 54.

No início do século XVIII as fábricas de pólvora de Alcântara e Barcarena (Lisboa) estavam em funcionamento [103]. Estas fábricas, localizadas relativamente perto do local onde foi sepultado o indivíduo em estudo, seriam uma excelente e contínua fonte de exposição para o Pb. De acordo com A. Shütz *et al.* [59], o Pb no osso aumenta com a duração do trabalho numa fundição de chumbo, cerca de $4.2 \mu\text{g/g}$ por ano, em trabalhadores alemães. O mesmo estudo indica as concentrações médias de Pb encontradas nos ossos de fundidores de chumbo alemães no ativo/reforma que correspondem a $71/150 \mu\text{g/g}$. O indivíduo 54 é do sexo masculino e teria aproximadamente 35 anos quando faleceu. Supondo que o indivíduo em estudo tenha trabalhado efetivamente numa fundição durante 20 anos, as concentrações anormalmente elevadas de chumbo nos seus tecidos podem ser explicadas, em conjunto com a contaminação *post-mortem* do solo.

Capítulo 7

Conclusões e perspectivas

7.1 Conclusões

No presente trabalho a determinação da composição elementar de restos humanos foi conseguida por EDXRF. As alterações diagenéticas responsáveis pela alteração da composição do osso, dependeram das propriedades do local de inumação e da estrutura do osso. A deterioração dos materiais, que constituem as canalizações existentes no local, pode ter desempenhado um papel fundamental na contaminação dos solos. Ademais, os resultados obtidos confirmaram que o osso esponjoso é mais suscetível à alteração *post-mortem* que o osso compacto.

Nos ossos estudados foram observadas concentrações elevadas de Zn que são indicativas de hábitos alimentares ricos em proteína de origem animal e certos vegetais. O Sr também evidenciou concentrações elevadas que não foram afetadas pela diagénese. O conteúdo deste elemento no osso pode ser associado à dieta, especialmente ao consumo de proteína de origem marítima. Os altos níveis do elemento Pb observados são essencialmente devidos à contaminação do sistema de canalização em chumbo. Na costela do indivíduo 17 foi evidenciada uma concentração elevada de Fe que aparenta indicar uma origem *ante-mortem*.

Relativamente aos dentes estudados, constatou-se que a polpa apresentava níveis muito elevados de Pb e Zn. De acordo com o padrão de distribuição elementar, ao longo do dente, conclui-se que estes elementos resultam da acumulação *ante-mortem*. As concentrações elevadas de Pb e Zn na parte interna do dente podem indicar que os indivíduos eram fumadores. Nos cabelos analisados foram encontradas concentrações elevadas de Ca, Fe, Cu e Pb. Estes valores podem ser indicativos tanto da contaminação *in vivo*, através da água utilizada na lavagem do cabelo, como da contaminação *post-mortem*, através das águas subterrâneas. No que concerne à massa encefálica, os níveis elevados de Ca, Fe e Cu resultam provavelmente da captação a partir do local de sepultamento.

No indivíduo 31 determinou-se nas amostras de cabelo, a presença de Hg em elevadas quantidades, até 6% (w/w). A análise das amostras restantes levou à conclusão de que a hipótese mais provável para a contaminação foi a aplicação externa de um produto no cabelo. Este produto foi provavelmente um medicamento para a desinfestação de piolhos. Como não existe evidência de Hg nos ossos, não se considera o envenenamento por Hg como a causa de morte do indivíduo. No indivíduo 54 foram encontrados níveis especialmente elevados de Pb nas costelas e na massa encefálica. A análise

do solo do local de sepultamento, e das restantes amostras do indivíduo 54 levaram à conclusão de que a contaminação não teve apenas uma origem *post-mortem*. A hipótese mais provável é que este indivíduo tenha estado diariamente em contacto com uma fonte externa de Pb. Deste modo, é possível que este indivíduo tenha trabalhado numa fundição de Pb.

Este estudo tem uma forte contribuição na compreensão dos hábitos alimentares, das práticas medicinais e das condições ambientais a que as populações estão sujeitas. Além disso, este trabalho demonstrou que as técnicas de fluorescência de raios-X são adequadas para a avaliação quantitativa de amostras biológicas, com a vantagem de ser não destrutiva.

7.2 Perspetivas Futuras

O estudo de elementos traço em tecidos biológicos abrange uma área de investigação muito diversificada. Relativamente a este trabalho, seria interessante dedicar uma investigação especial ao indivíduo 17. Para isso seria importante recolher mais amostras deste indivíduo para compreender se os níveis de Fe se mantêm elevados em todos os tecidos, e qual a sua origem. Ademais, também seria relevante desenvolver uma investigação com o objetivo de compreender e minimizar as diferenças observadas entre as concentrações de Fe e Cu nas duas montagens experimentais. No futuro, seria importante conjugar outros fatores como o sexo, a idade e causa de morte para correlacionar com os perfis elementares encontrados.

Bibliografia

- [1] T. António; F. Henriques, “A Ermida do Espírito Santo de Almada,” Câmara Munic. Almada, Div. Museus e Património Cult., pp. 150–154, 2012.
- [2] F. Curate; F. Henriques; S. Rosa; V. Matos; A. Tavares; T. António, “Mortalidade Perinatal Na Ermida Do Espírito Santo (Almada): Entre o Afecto e a Marginalização,” *Al-Madan*, vol. 19, pp. 68–76, 2015.
- [3] F. Curate; T. António; S. Rosa; F. Robles, “Fracturas bilaterales de tibia y peroné en un individuo femenino de la «Ermida Do Espírito Santo» (Almada, Portugal),” *Actas del XI Congr. Nac. Paleopatol.*, 2011.
- [4] M. L. Carvalho; J. Brito; M. Barreiros, “Study of trace element concentrations in human tissues by EDXRF spectrometry,” *XRay Spectrom.*, vol. 27, 1998.
- [5] B. Pemmer; A. Roschger; A. Wastl; J.G. Hofstaetter; P. Wobrauschek; R. Simon; H.W. Thaler; Roschger; K. Klaushofer; C. Streli, “Spatial distribution of the trace elements zinc, strontium and lead in human bone tissue.,” *Bone*, vol. 57, pp. 184–93, Nov. 2013.
- [6] P. Chevallier; I. Ricordel; G. Meyer, “Trace element determination in hair by synchrotron x-ray fluorescence analysis: Application to the hair of Napoleon i,” *X-Ray Spectrom.*, vol. 35, no. October 2005, pp. 125–130, 2006.
- [7] I. Baranowska; L. Barchanski; M. Bak; B. Smolec; Z. Mzyk, “X-ray fluorescence spectrometry in multielemental analysis of hair and teeth,” *Polish J. Environ. Stud.*, vol. 13, no. 6, pp. 639–646, 2004.
- [8] J. Rebôcho; M.L. Carvalho; A.F. Marques; F.R. Ferreira; D.R. Chettle, “Lead post-mortem intake in human bones of ancient populations by 109Cd-based X-ray fluorescence and EDXRF,” *Talanta*, vol. 70, pp. 957–961, 2006.
- [9] M. L. Carvalho; A.F. Marques; J.P. Marques; C. Casaca, “Evaluation of the diffusion of Mn, Fe, Ba and Pb in Middle Ages human teeth by synchrotron microprobe X-ray fluorescence,” *Spectrochim. Acta - Part B At. Spectrosc.*, vol. 62, pp. 702–706, 2007.
- [10] G. Piga; A. Santos-Cubedo; S. Moya Solà; A. Brunetti; A. Malgosa; S. Enzo, “An X-ray Diffraction (XRD) and X-ray Fluorescence (XRF) investigation in human and animal fossil bones from Holocene to Middle Triassic,” *J. Archaeol. Sci.*, vol. 36, pp. 1857–1868, Sept. 2009.
- [11] I. Reiche; L. Favre-Quattropani; T. Calligaro; J. Salomon; H. Bocherens; L. Charlet; M. Menu, “Trace element composition of archaeological bones and post-mortem alteration in the burial

- environment,” Nucl. Instruments Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. with Mater. Atoms, vol. 150, pp. 656–662, 1999.
- [12] J. Gonzalez-Rodriguez; G. Fowler, “A study on the discrimination of human skeletons using X-ray fluorescence and chemometric tools in chemical anthropology,” Forensic Sci. Int., vol. 231, pp. 407.e1–6, Sept. 2013.
- [13] M. L. Carvalho; C. Casaca; T. Pinheiro; J.P. Marques; P. Chevallier; A.S. Cunha, “Analysis of human teeth and bones from the chalcolithic period by X-ray spectrometry,” Nucl. Instruments Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. with Mater. Atoms, vol. 168, pp. 559–565, 2000.
- [14] R. Henrikson; J.E. Mazurkiewicz, NMS: Histology, vol. 518. Lippincott Williams & Wilkins, 127-141 ed., 1997.
- [15] S. Standring, Anatomia - A base anatómica da prática clínica. Elsevier Ltd, 40 ed., 2008.
- [16] K. Khan; H. McKay; P. Kannus; D. Bailey; J. Wark; K. Bennel, Physical activity and bone health. Human Kinetics, 2001.
- [17] D. Vargas; L. Audí; A. Carrascosa, “Peptídeos derivados do colágeno: novos marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo,” Rev. Assoc. Med. Bras., vol. 43, pp. 367–370, 1997.
- [18] J. D. Currey, Bones Structure and Mechanics. Princeton: Princeton University Press, 1ª edição ed., 2002.
- [19] B. Abernethy; V. Kippers; S. Hanrahan; A. McManus; L. MacKinnon, Biophysical Foundations of Human Movement. Human Kinetics, 3 ed., 2013.
- [20] M. L. Carvalho; A.F. Marques; M.T. Lima; U. Reus, “Trace elements distribution and post-mortem intake in human bones from Middle Age by total reflection X-ray fluorescence,” Spectrochim. Acta - Part B At. Spectrosc., vol. 59, pp. 1251–1257, 2004.
- [21] D. Phinney; J. Halstead, Dental Assisting: A Comprehensive Approach. Delmar, 4 ed., 2013.
- [22] B. Blausen, “Blausen gallery 2014,” [Internet] Disponível em: https://en.wikiversity.org/wiki/Wikiversity_Journal_of_Medicine/Blausen_gallery_2014. Data de Acesso: 12-08-2015.
- [23] Z. Zhou; Hai-Yang Yu; J. Zheng; Lin-Mao Qian; Y. Yan, Dental Biotribology. Springer, 1 ed., 2013.
- [24] A. Behrensmeyer; A.P. Hill, Fossils in the Making: Vertebrate Taphonomy and Paleoecology. University of Chicago Press, 1988.
- [25] K. T. Patton, Anatomy and Physiology. Elsevier Inc, 9 ed., 2013.
- [26] I. Kempson; E. Lombi, “Hair analysis as a biomonitor for toxicology, disease and health status,” Chem. Soc. Rev., vol. 40, pp. 3915–3940, 2011.
- [27] G. Jackson; Y. An; K. Konstantynova; A. Rashaid, “Science and Justice Biometrics from the carbon isotope ratio analysis of amino acids in human hair,” Sci. Justice, vol. 55, no. 1, pp. 43–50, 2014.

- [28] B. Young; J. Lowe; A. Stevens; J. Heath, *Wheater's Functional Histology: A Text and Colour Atlas*. Elsevier, 5 ed., 2006.
- [29] P. Ramos; A. Santos; N.R. Pinto; R. Mendes; T. Magalhães; A. Almeida, "Iron levels in the human brain: A post-mortem study of anatomical region differences and age-related changes," *J. Trace Elem. Med. Biol.*, vol. 28, no. 1, pp. 13–17, 2014.
- [30] B. Singh; D. Dhawan; B. Chand; P.C. Mangal; P.N. Trehan, "Trace element distribution in rat brain following lead and lithium supplementation-A study using an EDXRF spectrometer," *Appl. Radiat. Isot.*, vol. 46, no. I, pp. 59–64, 1995.
- [31] S. Takahashi; S. Hatashita; Y. Taba; X.Z. Sun; Y. Kubota; S. Yoshida, "Determination of the spatial distribution of major elements in the rat brain with X-ray fluorescence analysis," *J. Neurosci. Methods*, vol. 100, pp. 53–62, 2000.
- [32] D. Guimarães; M.L. Carvalho; V. Geraldes; I. Rocha; J.P. Santos, "Study of lead accumulation in bones of Wistar rats by X-ray fluorescence analysis: aging effect," *Metallomics*, vol. 4, pp. 66–71, Jan. 2012.
- [33] S. Bakirdere; N. Kizilkan; M. Yaman, "Determination of zinc, copper, iron, and manganese in different regions of lamb brain," *Biol. Trace Elem. Res.*, vol. 142, pp. 492–499, 2011.
- [34] A. Ide-Ektessabi; T. Kawakami; R. Ishihara; Y. Mizuno; T. Takeuchi, "Investigation on metal elements in the brain tissues from DNTC patients," *J. Electron Spectros. Relat. Phenomena*, vol. 137–140, pp. 801–804, 2004.
- [35] M. Rajan; K.S. Jagannatha Rao; B.M. Mamatha; R.V. Rao; P. Shanmugavelu; R. Menon; M.V. Pavithran, "Quantification of trace elements in normal human brain by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry," *J. Neurol. Sci.*, vol. 146, pp. 153–166, 1997.
- [36] N. Krebs; C. Langkammer; W. Goessler; S. Ropele; F. Fazekas; K. Yen; E. Scheurer, "Assessment of trace elements in human brain using inductively coupled plasma mass spectrometry," *J. Trace Elem. Med. Biol.*, vol. 28, no. 1, pp. 1–7, 2014.
- [37] T. Almeida, "Estudo Da Distribuição De Elementos Vestigiais Em Tecidos Humanos Saudáveis E Com Carcinoma Por Espectrometria De Raios – X," 2007. Tese de Doutoramento, Faculdade de Ciências - Universidade de Lisboa.
- [38] C. G. Fraga, "Relevance, essentiality and toxicity of trace elements in human health," *Mol. Aspects Med.*, vol. 26, pp. 235–244, 2005.
- [39] F. H. Nielsen, "Ultratrace elements in nutrition," *Annu. Rev. Nutr.*, vol. 4, pp. 21 – 41, 1984.
- [40] E. J. Massaro, *Handbook of Human Toxicology*. USA: Library of Congress, 1997.
- [41] W. Mertz, "The essential trace elements," *Science (80)*, vol. 213, pp. 1332–1340, 1982.
- [42] E. Valsami-Jones, *Phosphorus in Environmental Technologies: Principles and Applications*. London: IWA Publishing, 1 ed., 2004.
- [43] J. Anderson; S. Garner, *Calcium and Phosphorus in health and disease*. CRC Press, Inc, 1996.
- [44] C. Weaver; R.P. Heaney, *Calcium in Human Health*. New Jersey: Humana Press, Inc, 2006.

- [45] C. D. C. Department Health, "Iron-status indicators," tech. rep., National Center for Environmental Health, Atlanta, 2008.
- [46] J. Sullivan; G.R. Krieger, *Clinical Environmental Health and Toxic Exposures*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2 ed., 2001.
- [47] G. Roza, *Bromine*. New York: The Rosen Publishing Group, Inc, 1 ed., 2009.
- [48] D. Human Services, "Toxicological Profile fo Strontium," *Public Health*, no. April, 2003.
- [49] J. Risher; R. DeWoskin, "Toxicological Profile for Mercury," *U.S Public Heal. Serv. Agency Toxic Subst. Dis. Regist.*, no. March, p. 676, 1999.
- [50] V. Vardhan; S. Garg, "Mercury toxicity - A case report," *Med. J. Armed Forces India*, vol. 61, pp. 76–78, 2005.
- [51] M. L. Carvalho; M. Manso; S. Pessanha; A. Guilherme; F.R. Ferreira, "Quantification of mercury in XVIII century books by Energy Dispersive X-Ray Fluorescence (EDXRF).," *J. Cult. Herit.*, vol. 10, pp. 435 – 438, 2009.
- [52] H. Satoh, "Occupational and environmental toxicology of mercury and its compounds," *Ind. Heal.*, vol. 38, pp. 153 – 164, 2000.
- [53] J. Ericson; D.R. Smith; A.R. Flegal, "Skeletal concentrations of lead, cadmium, zinc, and silver in ancient North American Pecos Indians," *Environ. Health Perspect.*, vol. 93, pp. 217–223, 1991.
- [54] A. Agency Toxic Substance, "Public Health Statement for Lead," *Agency Toxic Subst. Dis. Regist.*, 2007.
- [55] E. Gonzalez-Reimers; M. Arnay-De-La-Rosa; J. Velasco-Vazquez; L. Galindo-Martin; E. Delgado-Ureta; F. Santolaria-Fernandez, "Bone lead in the prehistoric population of Gran Canaria.," *Am. J. Hum. Biol.*, vol. 11, no. May 1998, pp. 405–410, 1999.
- [56] C. Rubio; T. González-Iglesias; C. Revert; J.I. Reguera; A.J. Gutiérrez; A. Hardisson, "Lead dietary intake in a Spanish population (Canary Islands)," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 53, pp. 6543–6549, 2005.
- [57] E. Maynard; R. Thomas; D. Simon; C. Phipps; C. Ward; I. Calder, "An evaluation of recent blood lead levels in Port Pirie, South Australia," *Sci. Total Environ.*, vol. 303, pp. 25–33, 2003.
- [58] L. Gerhardsson, A. Akantis, N. G. Lundström, G. F. Nordberg, A. Schütz, and S. Skerfving, "Lead concentrations in cortical and trabecular bones in deceased smelter workers," *J. Trace Elem. Med. Biol.*, vol. 19, pp. 209–215, 2005.
- [59] A. Schütz; M. Olsson; A. Jensen; L. Gerhardsson; J. Börjesson; S. Mattsson; S. Skerfving, "Lead in finger bone, whole blood, plasma and urine in lead-smelter workers: Extended exposure range," *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, vol. 78, pp. 35–43, 2005.
- [60] B. Lanphear; K.J. Roghmann, "Pathways of lead exposure in urban children.," *Environ. Res.*, vol. 74, pp. 67–73, 1997.

- [61] V. Singh; V. Kumar; J. Sharma, "Importance of laser-induced breakdown spectroscopy for hard tissues (bone, teeth) and other calcified tissue materials," *Lasers Med. Sci.*, pp. 1–16, 2014.
- [62] J. Als-Nielsen; D. McMorrow, *Elements of Modern X-ray Physics*. United Kingdom: John Wiley & Sons, Ltd, 2 ed., 2011.
- [63] Bruker Nano GmbH, "Physical Principles of Micro-X-ray Fluorescence," in *M4 Tornado Phys. Princ.* (Bruker, ed.), (Berlin), pp. 1–59, 2011.
- [64] E. Haug; W. Nakel, *The Elementary Process of Bremsstrahlung*, vol. 73. Singapore: World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., 1 ed., 2004.
- [65] R. Jenkins, *X-RAY Fluorescence spectrometry*. John Wiley & Sons, Inc, 2^a ed ed., 1999.
- [66] L. Salgueiro; G. Ferreira, *Física Atomica e Nuclear*, vol. 1. 1 ed ed., 1970.
- [67] V. F. N. Filho, "Técnicas Analíticas Nucleares De Fluorescência De Raios X Por Dispersão De Energia (EDXRF) E Por Reflexão Total (TXRF)." 1999.
- [68] R. Van Grieken; A.A. Markowicz, *Handbook of X-ray spectrometry*, vol. 64. 2002.
- [69] J. Chavez, "Auger Electron Spectroscopy (AES) Confluence," 2011.
- [70] A. Moreno, "Non-Destructive Characterization of Artworks in Paper Support Using Spectroscopic Techniques," 2013. Tese de Doutoramento, FCT - Universidade Nova de Lisboa.
- [71] MySchool Vision, "Auger Electron Spectroscopy," 2009. [Internet] Disponível em: <http://www.myschoolvision.com/educational-materials/chemistry/auger-electron-spectroscopy/view.aspx>. Data de Acesso: 17-06-2015.
- [72] D. Guimarães, "Measurement of lead concentration in biological tissues by atomic spectroscopy techniques," 2011. Tese de Doutoramento, FCT-Universidade Nova de Lisboa.
- [73] G. Gauglitz; T. Vo-Dinh, *Handbook of Spectroscopy*. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2003.
- [74] C. Vaissière, J. Laberrigue-Frolow, Y. Sacquin, F. Hubaut, and G. Audi, "Radioactivite : Photoelectric Effect."
- [75] H. Günzler; A. Williams, *Handbook of analytical techniques*. Wiley-VCH, Weinheim; Chichester: Wiley-VCH, Weinheim; Chichester, 2001.
- [76] S. Pessanha; M.L. Carvalho; M. Becker; A. Von Bohlen, "Quantitative determination on heavy metals in different stages of wine production by Total Reflection X-Ray Fluorescence and Energy Dispersive X-Ray Fluorescence: Comparison on two vineyards," *Spectrochim. Acta - Part B At. Spectrosc.*, vol. 65, pp. 504–507, 2010.
- [77] K. Castro; N. Proietti; E. Princi; S. Pessanha; M.L. Carvalho; S. Vicini; D. Capitani; J.M. Madariaga, "Analysis of a coloured Dutch map from the eighteenth century: The need for a multi-analytical spectroscopic approach using portable instrumentation," *Anal. Chim. Acta*, vol. 623, pp. 187–194, 2008.

- [78] E. Santos; E.M. Gama; R. França; A.S. Souza; R.P. Matos, "Espectrometria de Fluorescência de Raios-X na Determinação de Espécies Químicas," *Enciclopédia Biofera*, vol. 9, pp. 3413–3432, 2013.
- [79] S. Scrivano, "Caracterización No-destrutiva de Joyas Arqueológicas de Oro mediante Micro Fluorescencia de Rayos X," 2015. Tese de Doutorado, Universidad de Sevilla.
- [80] M. L. Carvalho; T. Magalhães; M. Becker; A. Von Bohlen, "Trace elements in human cancerous and healthy tissues: A comparative study by EDXRF, TXRF, synchrotron radiation and PIXE," *Spectrochim. Acta - Part B At. Spectrosc.*, vol. 62, no. 9, pp. 1004–1011, 2007.
- [81] O. Gonzalez-Fernandez; S. Pessanha; I. Queralt, Ignacio; M.L. Carvalho, "Analysis of lead content in automotive shredder residue (ASR)," *Waste Manag.*, vol. 29, no. 9, pp. 2549–2552, 2009.
- [82] N. Estrada; F.M. Dos Santos Garrido; M.E. Medeiros; S. Machado, "Química combinatória de materiais com análise por microdifração de raios X. Primeira parte: Fundamentos," *Quim. Nova*, vol. 28, no. 4, pp. 670–677, 2005.
- [83] J. Silveira; J. Godinho; A. Mata; M.L. Carvalho; S. Pessanha, "Assessment of teeth elemental content using μ -EDXRF: effects by in-office and at-home bleaching products," *X-Ray Spectrom.*, vol. 44, no. 1, pp. 3–6, 2015.
- [84] A. Guilherme; A. Cavaco; S. Pessanha; M. Costa; M.L. Carvalho, "Comparison of portable and stationary x-ray fluorescence spectrometers in the study of ancient metallic artefacts," *X-Ray Spectrom.*, vol. 37, no. 1, pp. 444–449, 2008.
- [85] S. Török; P. Van Dyck; R. Van Grieken, "Heterogeneity effects in direct x-ray fluorescence analysis of hair," *X-Ray Spectrom.*, vol. 13, no. 1, pp. 27–32, 1984.
- [86] A. Rindby, "Software for energy-dispersive X-ray fluorescence," *X-Ray Spectrom.*, vol. 18, pp. 113–118, 1989.
- [87] B. Smodiš; R. Jaćimović; S. Jovanović; P. Stegnar, "Determination of trace elements in standard reference materials by the ko-standardization method," *Biol. Trace Elem. Res.*, pp. 43–51, 1990.
- [88] Evisa, "IAEA-085 Methylmercury, total mercury and other trace elements in human hair," 2003.
- [89] N. Scheid; S. Becker; M. Ducking; G. Hampel; T. Holdermann; J.V. Kratz; S. Schneiders; P. Weis, "Trace element and multi-isotope analysis of human head hair samples," *tech. rep.*, BKA Wiesbaden, 2006.
- [90] T. Hinnens; R. Hughes; P. Davis; K. Simon; D. Woolard, "Lead isotopes and additional analytes in NIST Bone ash," 1998.
- [91] D. Bellis; K. Hetter; M. Verostek; P. Parsons, "Characterization of candidate reference materials for bone lead via interlaboratory study and double isotope dilution mass spectrometry," *J Anal Spectrom.*, vol. 23, no. 3, pp. 298–308, 2008.
- [92] L. Pszonicki; A.N. Hanna; O. Suschny, "Report on Intercomparison IAEA/Soil-7 of the Determination of Trace Elements in Soil," *Tech. Rep. May*, International Atomic Energy Agency, 1984.

- [93] WEPAL, "Certificate of Analysis - International Plant-Analytical Exchange, RM IPE sample 954," tech. rep., Wageningen University - Environmental Sciences, 1990.
- [94] Canberra, "WinAxil X-Ray Analysis Software," 2004. [Internet] Disponível em: <http://www.canberra.com/cbns/products/cbns-software.asp>. Data de Acesso: 03-09-2015.
- [95] P. Custódio; S. Pessanha; C. Pereira; M.L. Carvalho; M.L. Nunes, "Comparative study of elemental content in farmed and wild life Sea Bass and Gilthead Bream from four different sites by FAAS and EDXRF," *Food Chem.*, vol. 124, pp. 367–372, 2011.
- [96] M. L. Carvalho; A.F. Marques, "X-ray fluorescence spectrometry: Applications in trace elements studies in human tissues from patients with cirrhosis," *X-Ray Spectrom.*, vol. 30, pp. 397–402, 2001.
- [97] M. L. Carvalho; A.F. Marques; J. Brito, "Synchrotron Radiation and Energy Dispersive X-Ray Fluorescence Applications on Elemental Distribution in Human Hair and Bones.," *AIP Conf. Proc.*, vol. 652, no. 2003, p. 522, 2003.
- [98] A. Gustaldi; A.H. Aparecida, "Fosfatos de cálcio de interesse biológico: importância como biomateriais, propriedades e métodos de obtenção de recobrimentos," *Quim. Nova*, vol. 33, no. 6, pp. 1352–1358, 2010.
- [99] S. Counter; L.H. Buchanan, "Mercury exposure in children: A review," *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, vol. 198, pp. 209–230, 2004.
- [100] G. Fornaciari; S. Marinozzi; V. Gazzaniga; V. Giuffra; M.S. Picchi; M. Giusiani; M. Masetti, "Short Article The Use of Mercury against Pediculosis in the Renaissance: The Case of Ferdinand II of Aragon, King of Naples, 1467–96," vol. 55, pp. 109–115, 2011.
- [101] K. Rasmussen; M. Torino; J. Glastrup; N.T. Ramseyer; P. Bjerregaard, "ON The Embalment Of S. Francesco Caracciolo," *Archaeometry*, vol. 54, no. September 2011, pp. 1100–1113, 2012.
- [102] R. Brenn; C.H. Haug; U. Klar; S. Zander; K.W. Alt; D.N. Jamieson; K.K. Lee; H. Schutkowski, "Post-mortem intake of lead in 11th century human bones and teeth studied by milli- and microbeam PIXE and RBS," *Nucl. Instruments Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. with Mater. Atoms*, vol. 158, no. 1, pp. 270–274, 1999.
- [103] R. Pinto, "As Indústrias Militares e As Armas de Fogo Portáteis no Exército Português," 2009. [Internet] Disponível em: http://www.revistamilitar.pt/artigo.php?art_id=528. Data de Acesso: 16-03-2015.

Apêndice A

Anexos

A.1 Limites de Detecção e Exatidão

Tabela A.1: Limites de detecção ($\mu\text{g/g}$) obtidos para o EDXRF com geometria triaxial para Bovine Bone 05-02, Bone Ash SRM NIST-1400, IAEA-085, DC73347 e para as Orchard Leaves - standard 1571.

	Bovine Bone	Bone Ash	IAEA-085	DC73347	Orchand Leaves
P	7900 \pm 400	8400 \pm 400			
S				1600 \pm 100	840 \pm 200
Cl					5000 \pm 2000
K		70 \pm 10			70 \pm 2
Ca	90 \pm 12	109 \pm 1	25 \pm 2	80 \pm 10	370 \pm 50
Mn	3 \pm 1	7 \pm 1	3 \pm 1	4 \pm 1	2,3 \pm 0,1
Fe		9 \pm 1	3 \pm 1	2,4 \pm 0,4	1,7 \pm 0,1
Cu		3 \pm 1	3 \pm 1	1,0 \pm 0,1	1,1 \pm 0,1
Zn	3 \pm 1	4 \pm 1	3 \pm 1	1,4 \pm 0,1	1,0 \pm 0,1
Se			2 \pm 1		
Sr	3 \pm 1	3 \pm 1			0,59 \pm 0,01
Hg			3 \pm 1		0,08 \pm 0,02
Pb	3 \pm 1			0,39 \pm 0,06	0,53 \pm 0,04

Tabela A.2: Comparação das concentrações ($\mu\text{g/g}$) de Bovine Bone 05-02 e Bone Ash SRM NISR-1400 obtidas no presente trabalho e os respectivos valores certificados.

	Bovine bone		Bone Ash	
	Obtido	Certificado	Obtido	Certificado
P	174000 ± 2000	120000	310000 ± 30000	179100 ± 1900
Ca	270000 ± 3000	260000	370000 ± 40000	381800 ± 1300
Mn		2,2		17*
Fe			690 ± 30	660 ± 30
Cu		1		2,3*
Zn	70 ± 8	80	180 ± 10	181 ± 3
Sr	130 ± 20	160	200 ± 20	249 ± 7
Pb	19 ± 5	$16,1 \pm 0,3$	14 ± 3	$9,1 \pm 0,1$

* Valor não Certificado.

Tabela A.3: Limites de Detecção ($\mu\text{g/g}$) obtidos no μEDXRF para o Bovine Bone 05-02 e Bone Ash SRM NIST-1400.

	Bovine Bone	Bone Ash
P	8700 ± 300	5700 ± 200
K	42 ± 5	
Ca	315 ± 2	207 ± 1
Fe	84 ± 8	$3,5 \pm 1,8$
Cu	$1,1 \pm 0,2$	
Zn	$10,1 \pm 0,4$	$6,8 \pm 0,4$
Sr	$7,1 \pm 0,3$	$6,7 \pm 0,2$
Pb		$3,3 \pm 0,4$

Tabela A.4: Limites de detecção e exatidão ($\mu\text{g/g}$) no μ -EDXRF para International Soil-Analytical Exchange – ISE- 954.

		ISE-954	
	LD	Obtido	Certificado
Si	19000 ± 900	220000 ± 30000	253000 ± 3800
K	650 ± 30	18000 ± 3000	19600 ± 900
Ca	300 ± 40	2000 ± 300	2070 ± 240
Ti	140 ± 8	7000 ± 2000	5570 ± 276
Mn	26 ± 3	300 ± 100	193 ± 13
Fe	27 ± 1	60000 ± 10000	47900 ± 165
Ni	15 ± 4	30 ± 9	$27,2 \pm 4,2$
Cu	7 ± 1	20 ± 5	$21,7 \pm 2,11$
Zn	7 ± 1	190 ± 20	$161 \pm 8,8$
Rb	13 ± 1	180 ± 30	$137 \pm 9,5$
Sr	6 ± 1	130 ± 20	$109 \pm 8,1$
Pb	3 ± 1	50 ± 10	$29,6 \pm 3,3$

A.2 Artigos Publicados

Journal of Trace Elements in Medicine and Biology 33 (2016) 26–30



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Trace Elements in Medicine and Biology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jtemb



Quantitative analysis of human remains from 18th–19th centuries using X-ray fluorescence techniques: The mysterious high content of mercury in hair



Sofia Pessanha^{a,b,*}, Marta Carvalho^{a,b}, Maria Luisa Carvalho^{a,b}, António Dias^{a,b}

^a LIBPhys-UNL, Laboratory for Instrumentation, Biomedical Engineering and Radiation Physics, 2829-516 Caparica, Portugal

^b Departamento de Física, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, 2829-516 Caparica, Portugal

ARTICLE INFO

Article history:

Received 5 June 2015

Received in revised form 6 August 2015

Accepted 14 August 2015

Keywords:

EDXRF

Mercury

Buried remains

Pediculosis

ABSTRACT

In this work, we report the unusual concentration of mercury in the hair of an individual buried in the 18th to mid-19th centuries and the comparison with the elemental composition of other remains from the same individual. Two energy dispersive X-ray fluorescence (EDXRF) setups, one with tri-axial geometry and the second one with micro-beam capabilities and a vacuum system, for light elements detection, have been used. Quantitative evaluation of the obtained spectra were made by fundamental parameters and winAXIL program by compare mode method. The levels of Hg in the hair of buried samples presented a concentration over 5% (w/w), a significantly lower presence of this element in the cranium, and no Hg in the remaining organs. Furthermore, there was no evidence of Hg in the burial soil, which has been also analyzed. From this result, we could conclude that the possibility of *post-mortem* contamination from the burial surroundings is very unlikely. The obtained results are indicative of the apparent use of a mercury-based compound for medical purposes, most likely lice infestation.

© 2015 Elsevier GmbH. All rights reserved.

1. Introduction

The analysis of human remains is a reliable source of information regarding the dietary habits, environmental surroundings and exposure to toxic elements of a particular population [1]. Bones, on the one hand, are considered good lifelong monitors for trace elements contamination [2], while hair is believed to provide clues regarding the timeline of the exposure to a given element [3]. Teeth can also be a valuable source to the knowledge of the habits of former civilizations considering that the diffusion pattern of some elements can give information both for archaeological purposes and diagenesis processes affecting the apatite ante-mortem elemental content [4]. However, post-mortem alterations of buried remains is always a problematic factor for archaeological and forensic studies. The extent of these alterations depends on direct environmental conditions such as groundwater, soil pH, redox potential and temperature [2]. Moreover, direct contamination of elements present in the burial soil must be taken into consideration.

X-ray fluorescence methods have proven to be suitable tools for studying the elemental composition of such samples. Carvalho et al. used total reflection X-ray fluorescence (TXRF) to study the elemental distribution and post-mortem intake of trace elements in bone from the middle ages [5] and synchrotron-based micro X-ray fluorescence (Sy-μ-XRF) to evaluate the diffusion of elements such as Ba and Pb in teeth from the same Era [4]. Piga et al. [6] used both a benchtop and a portable energy dispersive XRF equipment to study the bone fragments belonging to King Peter III of Aragon and Queen Blanche of Anjou and discovered the presence of elements related with the mummification processes.

Regarding hair analysis, and because the analysis are mainly performed directly on the hair samples, micro beam is paramount and Sy-XRF is the most used technique [7] sometimes complemented with TXRF [8]. In a more illustrious case study, hair samples of Napoleon I, collected through a course of 16 years, were analyzed using SXRF. The presence of toxic elements was compared in the different hair samples as well as longitudinally through each hair sample [9].

The choice of XRF for these studies relies in the non-destructive nature of the technique, allowing for the analysis without damaging the sample. Moreover, it is a multi-elemental technique, were all element are evaluated simultaneously. With the two setups used in this work combine the improved detection limits of a tri-axial

* Corresponding author at: LIBPhys-UNL, Laboratory for Instrumentation, Biomedical Engineering and Radiation Physics, 2829-516 Caparica, Portugal.

E-mail address: sofia.pessanha@fct.unl.pt (S. Pessanha).

geometry with the micro-beam and vacuum capabilities of the M4 Tornado setup.

The Ermida of Espírito Santo, in Almada (Portugal) was built in the 15th century and according to the records of Santa Maria do Castelo parish, it was used as burial site between 1755 until it was closed in the mid-19th century. In 2011, during some archaeological excavations, the remains of 83 individuals were recovered [10]. In this work, we report the elemental analysis of the remains of one specific individual, mainly hair and bones, focusing on the presence of unusual high amounts of mercury in the hair.

One can be exposed to mercury from breathing in contaminated air, from swallowing or eating contaminated water or food, or from having skin contact with it [11]. Not all forms of mercury can easily enter in our body, even when in contact with it. The most dangerous forms, from the toxicological point of view, are the metallic form, the divalent inorganic forms and methylmercury compounds [12]. Classical mercury poisoning is characterized by a triad of signs, namely tremors, erythema and gingivitis [12]. Some inorganic mercury compounds do not generally vaporize at room temperature like elemental mercury does. If inhaled or swallowed, they are not expected to enter in human body as easily as inhaled metallic mercury vapor [13]. Furthermore, inorganic mercury accumulates mostly in the kidneys and does not reach the brain as easily as metallic mercury [14]. Nevertheless, a small amount of the inorganic mercury can be changed by the organism into metallic mercury and leave in the breath as a mercury vapor [13].

Two different EDXRF setups were used in order to take advantage of their special features: a setup with tri-axial geometry in order to take advantage of the lower detection limits for low Z matrices [15], and a benchtop equipment allowing micro beam as well as performing analysis under vacuum fundamental for the detection of lighter elements, such as phosphorus in bones and teeth [16].

2. Materials and methods

2.1. Specimen description

During archaeological excavations, the remains of 83 individuals were found in the Ermida of Espírito Santo (Almada). In this work we will report the analysis of bones, hair and tooth of one particular individual, because of the unusual amount of Hg found in the remains. This was an adult female, approximately 50 years old, buried in a shroud, without coffin, and about 70 cm deep. The analyzed samples were: a strand of hair, a molar tooth and bones belonging to the cranium, ribs and hand phalange. In order to evaluate possible contaminations from the burial surroundings, we also analyzed the soil.

2.2. Energy dispersive X-ray fluorescence spectrometers

The spectrometer with tri-axial geometry used in this work is a commercial X-ray tube (Philips, PW 1140; 100 kV, 80 mA), equipped with a molybdenum (Mo) secondary target water cooled. The X-ray tube, the secondary target and the sample are in a tri-axial geometry. With this geometry it is possible to obtain a nearly monochromatic source, with K α and K β lines of Mo, energies 17.44 and 19.60 keV, respectively. With this arrangement, we decrease the background, taking advantage of the effect of the polarization of the incident X-ray beam from the tube and the nearly monochromatic radiation. Both the X-ray beam emitted by the secondary target and by the sample are collimated throughout two silver apertures, in order to reduce the scattered radiation and improve the detection limits. The characteristic radiation emitted by the elements is detected by a nitrogen-cooled Si(Li) detector

by Oxford Instruments (England) with energy resolution of 138 eV at 5.9 keV [15]. The operating conditions of this system were 50 kV and 20 mA with acquisition times of 1000 s. The quantitative evaluation for hair and bone samples was performed using Fundamental Parameter method, which determines the relative concentration of elements present in the sample making use of fundamental atomic parameters such as cross-sections for absorption and X-ray production, transition intensities, fluorescence yields, etc [17]. The suitability of the used method for the different matrices was recognized using appropriate standard reference materials (SRM): Bone Ash SRM NIST-1400 and Bovine Bone 05-02 (Department of Health, State of New York, USA) for bone samples; Methylmercury spiked human hair IAEA-085 (International Atomic Energy Agency) and DC73347-China National Analysis Center for iron and steel- for hair. Tables 1 and 2 present the Detection Limits (DL) and accuracy results obtained for these standard reference materials. Detection Limits were determined according to Silveira et al. [16].

In this work we also used a commercial spectrometer, the M4 Tornado by Bruker (Germany). The X-ray tube is a micro-focus side window Rh tube powered by a low power HV-generator and cooled by air. A poly-capillary lens is used to obtain a spot size down to 25 μ m for Mo-K α . The X-ray generator was operated at 50 kV and 300 μ A and a composition of filters was used to reduce background (100 μ m Al/ 50 μ m Ti/ 25 μ m Cu). Detection of fluorescence radiation is performed using a thermoelectrically cooled Silicon-Drift-Detector with energy resolution of 142 eV for Mn-K α . Measurements were carried out under 20 mbar vacuum conditions. This equipment was used to evaluate the presence of low-Z elements in all samples as well as performing mappings of cross sections of the bones and tooth samples. Spectra deconvolution and fitting were performed using WinAXIL software package (Camberra, Belgium) and quantification was performed through compare mode method [18]. This method makes use of SRM with the same matrix and similar elemental composition as the unknown sample to determine the sensitivity for each element and configure the quantification procedure.

Two SRM were used for the quantification of the burial soil: IAEA – soil 7 and International Soil-Analytical Exchange – ISE- 954.

Table 1 presents the Detection Limits obtained for Bone Ash SRM NIST-1400 and Bovine Bone 05-02 and IAEA – soil 7 (International Atomic Energy Agency) with the M4 Tornado. The accuracy of the proposed method for quantification of soil samples is presented in Table 2.

2.3. Sample preparation

Bone samples to be analyzed in the tri-axial setup were ground into a powder and pressed into pellets (2 cm diameter; 1 cm thickness) as described in Guimarães et al. [19]. Hair was analyzed in a strand as recommended by Török [20] in order to minimize heterogeneity effects. Sample hair was not washed according to the recommendation rules, taking into account that these samples are the only hair samples of the whole estate and are valuable for the museum. They were analyzed without any sample preparation.

Tooth samples were cut in longitudinal cross-sections using a microtome with diamond saw. The elemental mappings were performed directly on the specimen.

3. Results and discussion

The most significant result obtained in this study was the remarkable concentration of Hg in the hair samples, up to 6% (w/w) Fig. 1.

The quantifications obtained for the remaining elements are presented in Table 3. Regarding this amount of Hg it would be

Table 1

Detection limits (DL) obtained for Standard reference materials, Bone Ash SRM NIST-1400, Bovine Bone 05-02 NYS and IAEA-085 hair, using the tri-axial setup and for IAEA-soil 7 using the M4 Tornado.

	Bovine bone	Bone ash	IAEA-085	IAEA- soil 7
Si				15000
K		70		710
Ca	90	109	25	380
Ti				200
Mn	2	6	3	33
Fe		9	3	28
Ni				12
Cu		2	3	5
Zn	3	4	3	7
Se			2	
Rb				6
Sr	3	3		8
Hg			3	
Pb	3	2		5

Table 2

Accuracy ($\mu\text{g g}^{-1}$) and uncertainty obtained for Standard reference materials, Bone Ash SRM NIST-1400, Bovine Bone 05-02 NYS and IAEA-085, obtained with the tri-axial setup using Fundamental Parameters method evaluation, and for IAEA- soil 7 acquired with the M4 Tornado, quantification was performed using WinAXIL software package.

	Bovine bone		Bone ash		IAEA085		DC73347		IAEA-soil 7	
	Obtained	Certified	Obtained	Certified	Obtained	Certified	Obtained	Certified	Obtained	Certified
Si							50000 ± 5000	43000 ± 3000	230000 ± 90,000	180000 ± 11,000
S										
K			190 ± 20	186 ± 8					13000 ± 7000	12100 ± 800
Ca	274000 ± 20,000	260000	372000 ± 30,000	381800 ± 1300	850 ± 80	929 ± 81	2200 ± 400	2900 ± 300	160000 ± 60,000	163000 ± 60,000
Mn	4 ± 1	2.2	20 ± 4	17	10 ± 1	8.8 ± 0.4	6 ± 1	6.3 ± 0.8	2500 ± 1000	3000 ± 400
Ti									500 ± 200	631 ± 27
Fe			690 ± 30	660 ± 30	77 ± 6	79.3 ± 8.4	56 ± 10	54 ± 10	25000 ± 9000	25700 ± 500
Ni									29 ± 9	26 ± 5
Cu				2.3	18 ± 1	16.8 ± 0.9	15 ± 5	10.6 ± 1.2	15 ± 7	11 ± 2
Zn	70 ± 8	80	180 ± 10	181 ± 3	155 ± 10	163 ± 7	210 ± 20	190 ± 9	110 ± 40	104 ± 3
Rb									60 ± 20	51 ± 4
Sr	130 ± 20	160	220 ± 20	249 ± 7					130 ± 50	108 ± 5
Hg					21 ± 2	23.2 ± 0.8				
Pb	19 ± 3	16.1 ± 0.3	12 ± 3	9.1 ± 0.1			10 ± 1	8.8 ± 1.1	50 ± 20	60 ± 5

Table 3

Mean elemental concentration and uncertainty ($\mu\text{g g}^{-1}$) for hair, bones (spectra acquired using the tri-axial setup) and for soil (spectra acquired with the M4 Tornado)

	Hair	Cranium	Ribs	Hand phalange	Soil
Si					1800 ± 200
S	100000 ± 2000				180 ± 30
K	115 ± 20	1000 ± 100	1100 ± 100	1100 ± 100	1700 ± 200
Ca	12000 ± 1000	372000 ± 8000	344000 ± 5000	321000 ± 3000	140 ± 30
Ti					210 ± 30
Fe	690 ± 60	150 ± 20	670 ± 50	2600 ± 300	110 ± 40
Cu	2000 ± 100	34 ± 4	340 ± 20	790 ± 80	160 ± 30
Ni	51 ± 7				90 ± 20
Zn	1400 ± 100	330 ± 30	1300 ± 100	2900 ± 300	110 ± 10
As			20 ± 3	25 ± 3	
Br	1100 ± 200	15 ± 2	27 ± 4	9 ± 1	
Rb					120 ± 20
Sr	24000 ± 1000	220 ± 30	200 ± 20	220 ± 20	260 ± 30
Hg	60000 ± 5000	43 ± 4			
Pb	160 ± 20	160 ± 20	170 ± 20	230 ± 20	50 ± 10

of paramount importance to understand if the contamination was *ante-mortem* or *post-mortem*. The EDXRF spectra obtained for the soil collected from the burial site is presented in Fig. 2.

As it can be seen in the spectrum, there is no mercury peak present, and although we do not have Detection Limit for Hg in soil samples for this equipment, in Table 1 we can see that the DL for Pb is about $5 \mu\text{g g}^{-1}$, so the limit for Hg would be in the same order of magnitude. There is no mercury present in the soil, or its presence is in the ng g^{-1} order of magnitude, which means that the possibility of *post-mortem* contamination from the burial surroundings is very unlikely. The question remaining is if the mercury contamination was from an external or internal source. The elemental mapping

obtained for a slice of the tooth sample, does not reveal the presence of Hg in the internal/external parts of the tooth (Fig. 3). More interesting is the presence of Pb in higher amounts in the root of the tooth. Regarding the bone samples, Table 3 also presents the quantitative evaluations for the studied bones from the same individual. The only organ that presents mercury is the cranium, although in a significantly lower amount. According to Hac et al. [21] and considering the studies performed in rats contaminated with lead, the hair should reflect the content of bone during exposure, but after exposure the concentration should decrease strongly. Considering a similar behavior for mercury, the high concentration could only be explained by an external exposure and not ingestion of mer-

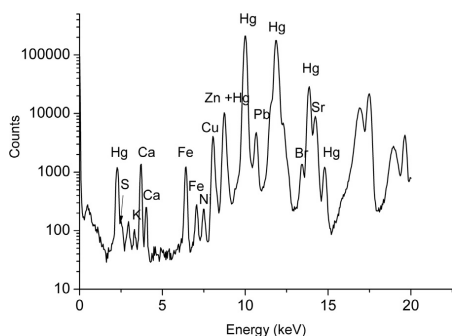


Fig. 1. Spectrum obtained with the tri-axial setup for a bundle of hair.

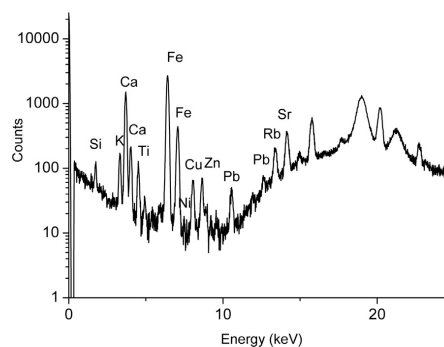


Fig. 2. Spectrum obtained with M4 Tornado for soil sample.

cury. Thus, the most likely hypothesis is that the mercury source was applied to the hair. This also explains the presence, in lower amounts, of mercury in the cranium, because some inorganic mercury can penetrate in the organism through the skin, but only a small amount is absorbed when compared to the quantity that gets into the organism from swallowing it [14]. The main explanation for applying mercury to the hair can be its use for lice infestation or pediculosis treatment [22,23]. The hair samples of Ferdinand II of Aragon (1467–1496), showed a high content of mercury, with a value of $827 \mu\text{g g}^{-1}$, determined by Atomic Absorption Spectroscopy [23]. Texts contemporary with Ferdinand show clearly

that mercury was also frequently employed in cosmetic recipes: quicksilver and sublimate were included in the composition of products used to whiten the skin, or to remove erythema, or other skin ailments [23].

Other elements were found in higher concentrations in hair sample such as S, Cu, Br and Sr. Sulfur is a major constituent of hair, as shown in the SRM DC73347, however a concentration up to 10% (w/w) might indicate the use of mercury in the mercuric sulfide form. Moreover, the remaining elements might as well belong to the anti-lice medicine used.

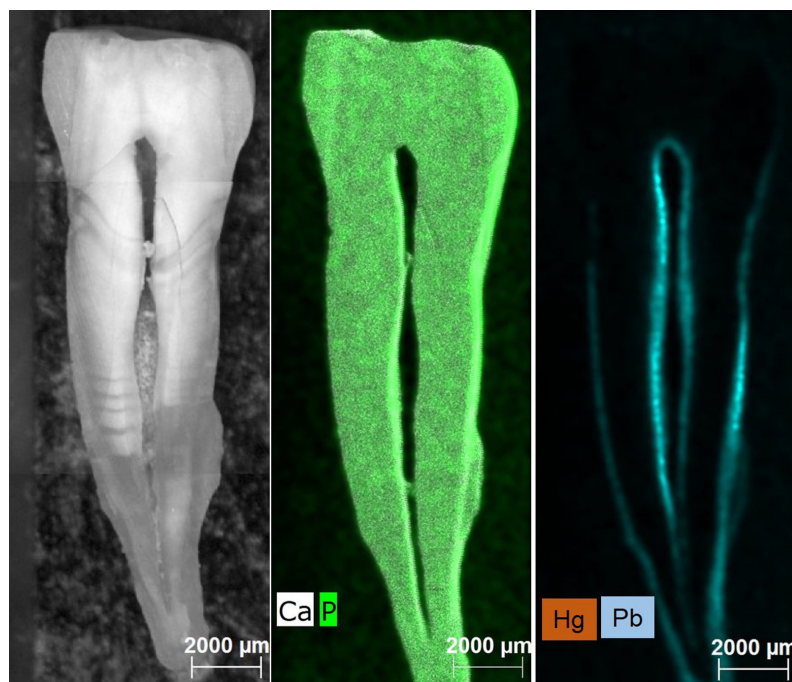


Fig. 3. Mapping of Ca, P, Hg and Pb for a section of the tooth.

4. Conclusion

In the present work the determination of the elemental composition of human remains was achieved by EDXRF. Using our methodology, the presence of high amounts of Hg was determined in the hair samples, up to 6% (w/w). The analysis of the remaining samples led to the conclusion that the most likely way of contamination was the external use of some hair product, probably anti-lice medicine. Although there is still limited information available on the dermal absorption of inorganic forms of mercury, it is already known that dermal contact with the inorganic mercury compounds may lead to dermatitis and other dermal effects, in addition to respiratory problems [24]. Once inorganic mercury enters into the bloodstream, it moves to several tissues [13], however, because there is no evidence of Hg in bones, we believe that this was not the case and do not consider poisoning by Hg the cause of death of the individual.

This work is a strong contribution to know human habits of ancient civilizations, namely it allowed to know that in 18th–19th centuries mercury compounds were still used for lice disinfection. In addition, this work demonstrated that X-ray fluorescence technique is appropriate for the quantitative evaluation of biological samples with the advantage of being non-destructive.

Acknowledgements

Authors would like to thank Almada Municipality, namely archaeologist Fernando Henriques Robles and anthropologist Francisco Curate for supporting the investigation. S. Pessanha acknowledges Portuguese Fundação para Ciência e Tecnologia for the post-doc grant SFRH/BPD/94234/2013.

References

- [1] M.L. Carvalho, J. Brito, M.A. Barreiros, Study of trace element concentrations in human tissues by EDXRF spectrometry, *X-ray Spectrom.* 27 (1998) 198–204.
- [2] M.L. Carvalho, A.F. Marques, Diagenesis evaluation in Middle Ages human bones using EDXRF, *X-ray Spectrom.* 37 (2008) 32–36.
- [3] I. Molina-Villalba, M. Lacasaña, M. Rodríguez-Barranco, A.F. Hernández, B. Gonzalez-Alzaga, C. Aguilar-Garduño, F. Gil, Biomonitoring of arsenic, cadmium, lead, manganese and mercury in urine and hair of children living near mining and industrial areas, *Chemosphere* 124 (2015) 83–91.
- [4] M.L. Carvalho, A.F. Marques, J.P. Marques, C. Casaca, Evaluation of the diffusion of Mn, Fe, Ba and Pb in Middle Ages human teeth by synchrotron microprobe X-ray fluorescence, *Spectrochim. Acta B* 62 (2007) 702–706.
- [5] M.L. Carvalho, A.F. Marques, M.T. Lima, U. Reus, Trace elements distribution and post-mortem intake in human bones from middle age by total reflection X-ray fluorescence, *Spectrochim. Acta B* 59 (2004) 1251–1257.
- [6] G. Piga, A. Brunetti, B. Lasio, S. Enzo, A. Malsosa, XRF investigation on skeletal remains from King Peter III of Aragon (1239–1285 A.D.) and Queen Blanche of Anjou (1280–1310 A.D.), *Appl. Phys. A* 114 (2014) 647–653.
- [7] L. Bertrand, J. Doucet, P. Dumas, A. Simionovici, G. Tsoucaris, P. Walter, Microbeam synchrotron imaging of hairs from Ancient Egyptian mummies, *J. Synchrotron Radiat.* 10 (2003) 387–392.
- [8] V. Trunova, N. Parshina, V. Kondratyev, Determination of the distribution of trace elements in human hair as a function of the position on the head by SRXRF AND TXRF, *J. Synchrotron Radiat.* 10 (2003) 371–375.
- [9] P. Chevallier, I. Ricordel, G. Meyer, Trace element determination in hair by synchrotron x-ray fluorescence analysis: application to the hair of Napoleon I, *X-ray Spectrom.* 35 (2006) 125–130.
- [10] Curate F, António T, Rosa S, Robles F. Fracturas bilaterales de tibia y peroné en un individuo femenino de la «Ermida do Espírito Santo» (Almada, Portugal), *Actas del XI Congreso Nacional de Paleopatología*, 2011.
- [11] M.L. Carvalho, M. Manso, S. Pessanha, A. Guilherme, F.R. Ferreira, Quantification of mercury in XVIII century books by energy dispersive X-ray fluorescence (EDXRF), *J. Cult. Heritage* 10 (2009) 435–438.
- [12] H. Satoh, Occupational and environmental toxicology of mercury and its compounds, *Ind. Health* 38 (2000) 153–164.
- [13] Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Public Health Service, U.S. Department of health and human services. Toxicological profile for mercury, 1999.
- [14] S.A. Counter, L.H. Buchanan, Mercury exposure in children: a review, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 15 (2004) 209–230.
- [15] S. Pessanha, A. Guilherme, M.L. Carvalho, Comparison of matrix effects on portable and stationary XRF spectrometers for cultural heritage samples, *Appl. Phys. A* 97 (2009) 497–505.
- [16] J. Silveira, J. Godinho, A. Mata, M.L. Carvalho, S. Pessanha, Assessment of teeth elemental content using μ -EDXRF: effects by in-office and at-home bleaching products, *X-Ray Spectrom.* 44 (2015) 3–6.
- [17] A. Rindby, Software for energy dispersive X-ray fluorescence, *X-ray Spectrom.* 18 (1989) 113–118.
- [18] M. Manso, S. Pessanha, F. Figueira, S. Valadas, A. Guilherme, M. Afonso, A.C. Rocha, M.J. Oliveira, I. Ribeiro, M.L. Carvalho, Characterisation of foxing stains in eighteenth to nineteenth century drawings using non-destructive techniques, *Anal. Bioanal. Chem.* 395 (2009) 2029–2036.
- [19] D. Guimarães, M.L. Carvalho, V. Gerales, I. Rocha, J.P. Santos, Study of lead accumulation in bones of Wistar rats by X-ray fluorescence analysis: aging effect, *Metallomics* 4 (2012) 66–71.
- [20] S. Török, P. Van Dyck, R. Van Grieken, Heterogeneity effects in direct x-ray fluorescence analysis of hair, *X-ray Spectrom.* 13 (1984) 27–32.
- [21] E. Hac, J. Krechniak, Lead levels in bone and hair of rats treated with lead acetate, *Bio. Trace El. Res.* 52 (1996) 293–301.
- [22] I. Ashkenazi, H.R. Desatnik, F.A. Abraham, Yellow mercuric oxide: a treatment of choice for phthiriasis palpebrum, *Br. J. Ophthalmol.* 75 (1991) 356–358.
- [23] G. Fornaciari, S. Marinuzzi, V. Gazzaniga, V. Giuffrè, M.S. Picchi, M. Giusiani, M. Masetti, The use of mercury against pediculosis in the renaissance: the case of Ferdinand II of Aragon, King of Naples, *Med.* 55 (2011) 109–115.
- [24] National Primary Drinking Water Regulations, US Environmental Protection Agency, 2006 [Online]. Available: <http://www.epa.gov/iris/subst/0692.htm> (assessed April 2015).



View Article Online
View Journal

JAAS

Accepted Manuscript

This article can be cited before page numbers have been issued, to do this please use: A. Dias, M. Carvalho, M. L. Carvalho and S. Pessanha, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2015, DOI: 10.1039/C5JA00340G.



This is an *Accepted Manuscript*, which has been through the Royal Society of Chemistry peer review process and has been accepted for publication.

Accepted Manuscripts are published online shortly after acceptance, before technical editing, formatting and proof reading. Using this free service, authors can make their results available to the community, in citable form, before we publish the edited article. We will replace this *Accepted Manuscript* with the edited and formatted *Advance Article* as soon as it is available.

You can find more information about *Accepted Manuscripts* in the [Information for Authors](#).

Please note that technical editing may introduce minor changes to the text and/or graphics, which may alter content. The journal's standard [Terms & Conditions](#) and the [Ethical guidelines](#) still apply. In no event shall the Royal Society of Chemistry be held responsible for any errors or omissions in this *Accepted Manuscript* or any consequences arising from the use of any information it contains.



www.rsc.org/jaas

Quantitative evaluation on ante-mortem lead in human remains of the 18th century by triaxial geometry and bench top micro X-ray fluorescence spectrometry

A. A. Dias¹, M. Carvalho¹, M. L. Carvalho¹ and S. Pessanha^{1*}

¹LIBPhys-UNL, Laboratory for Instrumentation, Biomedical Engineering and Radiation Physics, and Departamento de Física da Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, 2829-516 Caparica

*Corresponding author: sofia.pessanha@fct.unl.pt

Abstract

The aim of this work is to demonstrate the suitability of the commercial benchtop micro X-ray fluorescence (μ -XRF) system M4 Tornado, to evaluate the differences on lead distribution in the different bone and tooth structures. *Ante-mortem* and *post-mortem* Pb accumulation was also assessed and the lead amount in the different tissues was compared. Micro-XRF based in polycapillary systems is a relatively new technique with capabilities to provide multielemental maps and quantitative measurements. Another advantage of the technique is being non-destructive and requiring only a small amount of sample.

In this work we measured the lead concentration in human remains, bone and tooth of an 18th century young male subject, around 30 years old, and compared the results obtained using the μ -XRF with a setup with triaxial geometry. Accuracy of the microanalytical system for pressed pellets and cross sections of bone and tooth were also certified.

The μ -XRF setup provided analytical point spectra, line profiles and elemental maps for Pb and Ca distribution in bone and tooth. The quantitative calculations were accessed by the fundamental parameters and compared mode methods. The accuracy and the detection limits were checked using standard reference materials for Ca, Zn, Sr and Pb. Furthermore, unusual extremely high amounts of Pb in cortical bone, tibia and fibula, were observed, reaching $120 \pm 10 \mu\text{g.g}^{-1}$, while the trabecular region reached $250 \pm 20 \mu\text{g.g}^{-1}$. Rib presented the highest levels, $560 \pm 30 \mu\text{g.g}^{-1}$. In tooth structure the highest amount of Pb was found in pulp and root with $130 \pm 50 \mu\text{g.g}^{-1}$. Low levels of Pb in the surrounding soil have been found.

Keywords: Lead concentration; human bone; micro-X ray fluorescence; triaxial geometry; tooth;

1. Introduction

X ray fluorescence technique is known to be a powerful technique for measurement of trace elements in a variety of solid matrices, including biological and environmental samples¹⁻⁵. In the past 20 years much research has been done measuring trace elements and elemental constitution of human bone, many of them using X-ray Fluorescence. Spatial distribution of trace elements at the micrometer scale, were obtained in bone, by a benchtop monochromatic microbeam X-ray fluorescence setup⁶. PIXE and nuclear microprobe were also used for elemental distribution⁷⁻¹⁰. The concentration of lead in tibia (cortical bone) and calcaneus (trabecular bone) was measured by an *in vivo* X-ray fluorescence technique in active contemporary workers with a system based on the non-invasive 109Cd excited K X-ray fluorescence technique¹¹⁻¹⁴. Chemical analyses and atomic absorption spectroscopy allow measurement of the elemental concentration, but they have the disadvantage of being destructive¹⁵. Lead concentrations in several cortical and trabecular bones in deceased smelter workers has been obtained by electrothermal atomic absorption spectrometry¹⁶. Laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry has also been used for quantitative measurements of lead in bone¹⁷. Electron probe micro analyses offer a spatial resolution in the micrometer and sub-micrometer range, but suffer from low sensitivity for some elements such as Sr, U, Ba, Zn and Pb, which are often present in fossilized bone^{18, 19}.

PIXE and X-ray micro fluorescence analyses are both multielemental, non-destructive and the detection limits are at the μg level. The spatial resolution reachable depends on the experimental set-up and is in the range of μm^2 to several mm^2 . Synchrotron microprobe has also been used in bone analysis²⁰.

A potentially important and little explored application of micro X-ray fluorescence (μXRF) is the measurement of the spatial elemental distribution in forensic applications, namely the elemental distribution of lead or other toxic metals in gunshot residues^{21,22}. Such studies are required to develop and understanding the biological fate of ingested heavy metals or poisoning compounds following environmental or occupational exposure, or following deliberate administration during drug therapy. In the case of lead, this data would be valuable for the application of bone lead measurements as a biomarker and determining Pb long-term ingestion or acute intoxications. Whilst

qualitative or semi-quantitative data are sufficient for some applications, rigorous quantitative analysis is desirable for clinical, biomedical and forensic samples²³.

Bone and tooth are the hardest structures of the human body. Both have been considered good biomarkers for man elemental exposure being the main targets for the deposition of heavy metals, and good indicators for long range exposure. Bone consists of cortical (substantia compacta) as well as trabecular bone (substantia spongiosa). The high porosity of the spongy bone and its open morphology makes it more susceptible to *post-mortem* alteration^{24, 25}. Tooth consists of three main components: enamel, dentine and pulp. In human remains, lead can be both from *post-mortem* and *antemortem* origin. Inner compact tissue might represent in vivo accumulation and trabecular one corresponds to uptake during burial. Physical and chemical changes can occur in bone during its burial period. As bone is fossilized, the natural process of diagenesis serves to alter the bone composition from its *ante-mortem* state. These processes and their rate of reaction mainly depend on direct environmental conditions such as groundwater, soil composition, soil pH, redox potential and temperature.

In this work the spatially resolved elemental analysis in human remains, bone and tooth has been achieved by the micro-analytical commercial M4 Tornado (Bruker) with capability for elemental distribution at a spatial resolution of 25 μm . This is a benchtop nondestructive method and the quantification process is easy to handle with appropriate calibration. The quantitative calculations were checked by a second equipment with triaxial geometry and very well documented for many kinds of samples²⁻⁵. The results obtained with the two systems in terms of Pb *antemortem* accumulation from environmental exposure during life and *post-mortem* uptake from the burial place, are discussed and explored through the distribution patterns of Pb along the tooth, and bone. The obtained values show strongly increased levels of lead especially in spongy bone. However, the compact bone also showed unusually high values for this element, which may indicate *ante-mortem* Pb-exposure. Furthermore, in the tooth, the highest values of Pb were found in the pulp and root, confirming *ante-mortem* Pb-exposure, considering that low levels of Pb in soil were found.

2. Experimental

2.1. Sample collection and preparation

In this work we report the analysis of several bones and teeth of one particular subject, who was part of a collection of 83 individuals recovered from the inside of a chapel, dating from 18th-19th centuries²⁶. This was a young male, around 30 years old, laying about 1 m deep. The bone material consisted of several ribs, foot bone, thighs, skull, femur, fibula and tibia both compact and trabecular bones. Several teeth were also collected. In order to evaluate possible contaminations from the burial surroundings, we also analyzed the soil.

Each bone and tooth were rinsed in tap water and carefully brushed, to remove completely the soil. After this cleaning process the samples were washed in distilled water, dried in a clean environment at room temperature.

From each bone a few grams from the inner compact and trabecular area bone were taken, by means of a polyester tool. Prior to analysis each sample was powdered in a polyester mill and the obtained fine powder was pressed into pellets 1.5 cm in diameter and 1 mm thick, without any chemical treatment. A minimum of three pellets of each sample, and a minimum of 3 samples of each type were taken to minimize the effects of inhomogeneity. Each pellet was glued on a Mylar film, on a sample holder and placed directly under the X-ray beam, for elemental determination, as described in Guimarães et al³.

During the grinding sample preparation, special care has been paid to contamination, as well as during the whole procedure. All the material used is made of polyester, to avoid any contact with metals. For microanalysis, transversal sections of femur and longitudinal slices of tooth, around 1mm thick, were obtained with a microtome equipped with a diamond saw and the samples were placed directly on the x-ray microbeam.

2.2. Experimental setup

2.2.1. Benchtop microanalytical system

In this work we used a commercial benchtop spectrometer, the M4 Tornado by Bruker (Germany) for elemental mapping. The X-ray tube is a micro-focus side window Rh tube powered by a low power HV-generator and cooled by air. A poly-capillary lens is used to obtain a spot size down to 25 μm for Mo-K α . The X-ray generator was operated at 50 kV and 300 μA and a composition of filters was used to reduce the background (100 μm Al/ 50 μm Ti/ 25 μm Cu). Under these conditions we could almost eliminate

the energy radiation below 9 keV of the bremsstrahlung. This, together with the preferential reflexion energy for the poly-capillary, the experimental setup allows a quasi-monochromatic beam between 9-15 keV, much better than the white incident beam originated from the X-ray tube. The detection of the fluorescence radiation is performed using a thermoelectrically cooled Silicon-Drift-Detector with energy resolution of 142 eV for Mn-K α .

Measurements were carried out under 20 mbar vacuum conditions. The vacuum system avoids back diffusion and improves detection limits. This equipment was used to perform mappings of cross sections of the bones and tooth samples. Spectra deconvolution and fitting were performed using WinAXIL software package (Canberra, Belgium) and quantification was performed through compare mode²⁷. This method makes use of SRM with the same matrix and similar elemental composition as the unknown sample to determine the sensitivity for each element and configure the quantification procedure.

2.2.2. Triaxial geometry

One of the used spectrometers to quantify Pb in bone consists of a high power X-ray tube with a tungsten anode, water cooled, equipped with a changeable secondary target of molybdenum. This arrangement makes it possible to obtain a monochromatic source and to select the secondary target in order to get the best excitation conditions for a special element. The X-ray tube, the secondary target and the sample are in a triaxial geometry. With this arrangement we decrease the background, taking the advantage of the effect of the partial polarization of the incident x-ray beam from the tube, and so improving the detection limits²⁸. The characteristic radiation emitted by the elements present in the sample was detected by a Si(Li) detector, with a 30 mm² active area and 8 μ m beryllium window. The energy resolution is 135 eV at 5.9 keV and the acquisition system is a Nucleus PCA card. The X-ray generator was operated at 50 kV and 20 mA and a typical acquisition time of 1000 s was used. The beam size on the sample is around 1.5 cm x 2.0 cm. Quantitative calculations are made through the fundamental parameters method. Experimental parameters were obtained through calibration, using standard reference bone materials.

3. Accuracy tests

3.1. Pressed pellets

The accuracy of the benchtop microanalytical system has been checked by analyzing pressed pellets of, SRM NIST-1400 bone ash ($9.1 \mu\text{g g}^{-1}$ of Pb), NYS RM 05-02 bovine bone ($16.1 \mu\text{g g}^{-1}$ of Pb) and NYS RM 05-04 caprine bone ($31.5 \mu\text{g g}^{-1}$ of Pb) pellets and the values are presented in Table 1. The detection limits were also obtained and are presented in the same table. As one of the main goals of this work is to study the performance of this microanalytical system for Pb evaluation, we checked other bone reference materials with lower amount of Pb, NYS RM 05-01, bovine bone with $1.09 \mu\text{g g}^{-1}$ and NIST SRM 1486, bone meal, with an amount of Pb $1.4 \mu\text{g g}^{-1}$. It was not possible to detect Pb for the first material and for the second one it was impossible to quantify. Considering that this technique is multielemental, besides Pb, the accuracy and the detection limits have been also evaluated for Ca, Zn and Sr, elements of foremost importance for their relationship to Pb²⁹. Burial soil has also been analyzed and the accuracy of the system for this complicated matrix has also been checked by SRM IAEA-soil 7. The results are presented in Table 2.

The accuracy of the triaxial geometry system for bone samples was checked by analysis of two pressed pallets of standard reference materials; caprine bone NYS RM 05-04 and caprine bone NYS RM 05-02, with 30 and $16 \mu\text{g g}^{-1}$ Pb concentration respectively. The accuracy and detection limits were also calculated and the results are presented in Table 1.

Considering that the amount of Pb in the present bone samples was much higher than the one in the reference material, the accuracy of the systems for such high values needed further requirement. Taking into account the lack of such certified reference materials in the market, another bone sample previously analyzed has been used as reference. In a previous work², bone samples have been studied by ¹⁰⁹Cd-based X-ray fluorescence. Pressed pellet samples with an amount of Pb of $330 \mu\text{g g}^{-1}$ have been used. Together with these pellets, reference calibrated phantoms of plaster of Paris reference material with ($200 \mu\text{g Pb/g}$ bone mineral) have also been used.

3.2. Mapping

Transversal cross-sections from the tibia and longitudinal cross-sections from the teeth were cut by a microtome with a diamond saw, 1 mm thick. Each sample was mounted directly on a table 360 mm x 260 mm, which was attached to a stage translatable along

XY, and analysed directly by μ XRF. The scanning step size was 25 μ m. For each point, the counting time was 3.76 s.

Each sample was analyzed over a period of 12 h, to accumulate sufficient data points for high resolution mapping. The analysis was fully automated and unattended. The counting time and the scanning spatial resolution are freely selected according to the required resolution. A CCD camera allows visualize the studied area. The data output was arranged into a table giving the X-ray intensity of specific X-ray peaks representing element signals each measured point defined by its X and Y coordinate (μ m).

The data were converted using the software's function into a data matrix, from which XY contour maps (2-dimensional maps) of the data were generated for each element. In Fig. 1 and 2 the elemental maps for Pb and Ca both in tibia and tooth cross section respectively, are presented.

4. Results and Discussion

4.1. Quantification on pressed pellets

From the results presented in Tables 1 and 2 for accuracy in bone and soil pressed pellet samples we can conclude that very good agreement is obtained with the microanalytical equipment. From Table 1 we also conclude that good agreement between reference bone material and the values obtained with the triaxial system is observed. Furthermore, when we compare the results obtained by the microanalytical system, with the obtained by the triaxial one, the most important finding is that the uncertainty of the obtained values is higher in the microanalytical system. In Fig. 3 we display one spectrum of a bone obtained with both setups, to better evidence the background obtained by the two systems. There is a reduction on the scattered radiation in the microanalysis system in the interest region and especially on the low energy side, with the vanishing of the Ar from the air, due to vacuum conditions. This is essential when light elements are important like P in tooth. Moreover, the use of the polycapillary also contributes to improve the background to peak ratio.

The elemental distribution Ca and Pb can be observed in Fig. 1 for tooth longitudinal cross section and in Fig. 2 for tibia transversal cut, respectively for Ca and Pb. Calcium is more or less uniformly distributed in both samples, Pb appeared to be enriched in the inner part of the tooth, pulp and root. Concerning bone samples an increase of Pb is

visible on the outer surface. In the inner spongy bone we distinguish small spots with enhanced level of Pb.

From the literature we can find studies devoted to assess *post-mortem* Pb in bones buried in contaminated environments and on the other side we can find research works dedicated to the *ante-mortem* Pb distribution and quantification. In this case we can find studies obtained either by *in vivo* analysis or from autopsy of deceased people.

Buried bones in contaminated environments were studied by M. L. Carvalho^{1,2,30} in contaminated soils and a lead coffin by X-ray fluorescence based techniques. Femoral sections of a woman skeleton buried in lead sarcophagus were also studied¹⁰. Another important study on Pb uptake from the burial soil was the study of a mining population buried in a very high Pb contaminated soil close to the mining area⁹. In all studies the levels of Pb in the outer parts of the bone or in the trabecular regions were tremendously increased evidencing strong *post-mortem* enrichment of Pb. The highest concentrations correspond to large pores and voids in the bone structure, while compact tissue with harder structure is less susceptible to Pb uptake. The exchange mechanisms between the archaeological bone and its neighborhood were obvious. The concentration profiles obtained from the outside of the bone to the inner part confirm that Pb penetrated into the bone matrix. The diffusion of the metal was from the outside to the inner structure of the compact bone, which remained almost non-affected. The ratios between concentration values in the different structures reached one to several orders of magnitude, depending on the degree of contamination of the mortuary environment. The amount of Pb deeply decreased from the affected areas to the inner compact bone showing that the Pb in bones was obtained by *post-mortem* uptake.

Concerning *ante-mortem* Pb distribution it can be obtained either by *in vivo* analysis or from autopsy in deceased people. The most relevant work on *in vivo* analysis can be found in a summarized work by D. Chettle¹⁴. Furthermore three works on deceased people deserve to be referred^{8, 16, 29}. U. Lindh⁸ carried out by micro-PIXE with a spatial resolution of 5 μm , the analysis of two human femurs; one belonged to a worker exposed to lead in heavy metal industry, and the other worker was from the same environment but not exposed to lead. The mean lead concentration in the poisoned and the reference case in compact bone was 70 and 30 $\mu\text{g g}^{-1}$, respectively. The poisoned case exhibited two peaks in the distribution, at distances of approximately 0.2 and 1.8 mm from the periphery, respectively.

The work of L. Gerhardsson¹⁶ aimed to compare bone lead concentrations in several cortical and trabecular structures in long-term exposed lead smelter workers, and to relate the measured concentrations to the corresponding ones in non-exposed workers. He analyzed, by electrothermal AAS, seven bones (trabecular: sternum, vertebrae, iliac crest, rib; cortical: femur, forefinger, and temporal bone) in 32 male, long-term exposed to lead and 10 non-unexposed male, reference persons. Furthermore this study presents values for Sr and Zn in the same bones. Todd²⁹ studied by electrothermal AAS adult human tibia for lead concentration determination. The goal of this work was to determine whether there were any differences between core and surface tibia lead concentrations. Lead concentrations in the nine tibiae ranged from 3.1 to 27.9 µg lead/g of dry bone. They concluded that the studied human tibiae showed a greater surface tibia lead concentration than core tibia lead concentration by a factor of the order of 2. The indication of preferential accumulation in trabecular (spongy) rather than cortical bone by a factor around 1.4 in contaminated people was observed by Gerhardsson¹⁶. A factor of 2 has been observed by Chettle¹⁴ by in vivo analysis of calcaneus and tibia. In the present work the concentration values obtained in pressed pellets for the several bones are presented in tables 3 and 4 respectively for M4 Tornado and triaxial system for Ca, Zn, Sr and Pb. The agreement between the results obtained with both systems is remarkable. However, as already noticed for accuracy authentication, the uncertainties are higher for microanalytical system, of the order of 20% while for the triaxial system the uncertainty is around 10%. Nevertheless, from these values we can deduce that quantification for the benchtop microanalytical system with reasonable accuracy for Ca, Zn, Sr and Pb in pressed pellets is possible. The highest values for Pb were found in spongy bones: ribs, followed by the skull, foot bone, femur, fibula and tibia. Finally the inner part of thick compact bones, fibula and tibia present the lowest concentrations. The ratio between the content of Pb in both spongy and compact area of the same bone is around 2. The relation between the amount of Pb in these bones is similar with the one obtained by Gerhardsson¹⁶ in workers exposed to Pb contamination for around 30 years. However the values obtained in the present work are much higher than the mean values in that work. In Fig. 4 we can compare a spectrum from soil and compact bone. It is obvious that Pb in soil is much lower than in bone. From this result and considering that the ratio Pb content in spongy and compact bone is of the order of 2 we can deduce that the subject under study was *ante-mortem* contaminated.

Concerning the values of Sr they are more or less constant in all the studied bones, as well as the levels of Ca. Unlikely, Zn presents high variation in the different bones.

4.2. Quantification in microanalysis elemental distribution

For complete calibration of the benchtop system it is necessary to guarantee that quantification directly on the samples, without any sample preparation, is possible and accurate. This is actually the main goal of this study. To accomplish this purpose we used the slices of tibia bone and tooth and carried out quantitative calculations on several points. The results obtained for tibia are displayed in Fig. 5. They are in very good agreement with the corresponding ones obtained in pressed pellets. The lowest concentration values are obtained in the inner part of the tibia compact bone and enriched levels are observed on the direction of the spongy bone. A tendency to accumulation in the outer surface is also evident, in agreement with the results observed in the distribution mapping. Furthermore we also could confirm a factor of 2 for the ratio between the minimum and maximum value, in agreement with the attained values in pressed pellets. Determination on the micro distribution of Sr and Pb have been carried out by Bellis⁶ using a prototype benchtop XRF system based on focused monochromatic microbeam X-ray fluorescence with a low power source coupled to doubly curved crystal (DCC) optics. However in this work the authors do not performed quantitative calculations. Only elemental maps have been obtained. Elemental distribution is not enough in most cases, as referred, and quantitative analysis is crucial. The conclusions of the present work are however similar to those obtained by Bellis. Lead appeared to accumulate in a thin band near the periosteal surface. Elevation in scattered discrete spots was also observed at the endosteal surface, and to a lesser extent within the core, also in agreement to the findings of Todd²⁹, who found that Pb measurements performed on human tibiae showed that Pb was enriched at the tibia surface relative to the core and that lead concentrations were significantly lower toward the ends of the tibia sections.

For tooth quantitative elemental micro analytical calculations we obtained the values for P, Ca, Zn, Sr and Pb. The values are presented on table 5. Two different parts can be considered; the pulp and the hard enamel, dentine and root. Pulp presents a completely different matrix in what concerns P, Ca, Sr and Zn, although presenting the highest values for Pb accumulation. This pattern is in agreement with lead *ante mortem*

intoxication³¹⁻³³. Lead circulates in very high concentrations in blood of intoxicated people and might accumulate preferably in pulp region highly irrigated. Phosphorus and Ca are more or less constant in enamel, dentine and root. Zinc is enriched in root following the behavior of Sr and Pb.

5. Conclusions

From this work we could conclude that micro X-ray analytical technique based on a polycapillary system is a powerful technique for Pb determination in hard and soft tissues at the level of $3 \mu\text{g g}^{-1}$ with 20% uncertainty. Furthermore we also demonstrate the capabilities for elemental distribution with micrometer resolution and quantitative calculations for other elements of biological interest, like P, Ca, Zn and Sr. These are obvious advantages when comparing this system to other XRF based techniques, like synchrotron radiation. Furthermore, the other benefits of the system, being non-destructive and very low amount of sample being necessary make it the preferred choice instead of AAS, ICPMS, LA-ICP-MS when non-destructive process is required. In addition, our results indicate a tendency of higher accumulation of lead in spongy bones. Finally the inner part of thick compact bones, fibula and tibia present the lowest concentrations. The ratio between the content of Pb in both spongy and compact area of the same bone is around 2. This was the ratio found by Chettle¹⁴ when analyzing the bones of exposed individuals. The ratio of Pb in buried bones in contaminated environment is much higher, from 1 to several orders of magnitude^{1, 2, 9, 10}. Moreover, to support the *ante-mortem* contamination explanation, we believe that it is unlikely that a soil about $50 \mu\text{g g}^{-1}$ of Pb³⁴ was the cause for contamination. We were dealing with a case of severe lead poisoning of a rather young man. An important source of Pb intake might have been linked to smelter exposure. In addition, the properties of lead, its corrosion resistance and formability, made it extensively used in plumbing, building, and ship construction existing in the area.

Acknowledgements

Authors would like to thank Almada Municipality, namely archaeologist Fernando Henriques Robles and anthropologist Francisco Curate for supporting the investigation.

S. Pessanha acknowledges Portuguese Fundação para Ciência e Tecnologia for the post-doc grant SFRH/BPD/94234/2013.

References.

A. Name, B. Name and C. Name, *Journal Title*, year, **volume**, page

1. M.L. Carvalho, A.F. Marques, M.T. Lima, U. Reus, *Spectrochim. Acta B At. Spectrosc.*, 2004, **59**, 1251–1257.
2. J. Rebôcho, M. L. Carvalho, A.F. Marques, F. R. Ferreira, and D. R. Chettle, *Talanta*, 2006, **70**, 957–961.
3. D. Guimarães, M. L. Carvalho, V. Geraldès, I. Rocha, and J. P. Santos, *Metallomics*, 2012, **4**, 66–71
4. E. Margui, A. F. Marques, M. L. Prisa, I. Queralt, M. Hidalgo and M. L. Carvalho, *Appl Spectrosc*, 2014, **68**, 1241–1246
5. O. Gonzalez-Fernandez, M. J. Batista, M.M. Abreu, I. Queralt, M.L. Carvalho, *X-Ray Spectrom.*, 2011, **40**, 353–363
6. D. J. Bellis, D. Li, Z. Chen, W. M. Gibson, and P. J. Parsons, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2009, **24**, 622–626
7. T.A. Elliott, G.W. Grime, *Nucl. Instr. Meth. B*, 1993, **77**, 537.
8. U. Lindh, G. Nordberg, and D. Brune, *Sci of the Total Environm.*, 1978, **10**, 31–37
9. R. Brenn, Ch. Haug, U. Klar, S. Zander, K.W. Alt, D.N. Jamieson, K.K. Lee and H. Schutkowski, *Nucl Inst and Meth B*, 1999, **158**, 270–274
10. N. Boscher-Barre, P. Trocellier, *Nucl. Instr. Meth. B*, 1993, **73**, 413.
11. C. L. Gordon, D. R. Chettle and C.E. Webber, *British J. of Indust Med*, 1993, **50**, 637–641
12. J. A. A. de Brito, M L Carvalho and D R Chettle, *Phys Med Bio*, 2009, **54**, 919–934
13. J. Brito, F. E. McNeill, C. E. Webber, S. Wells, N. Richard, M. L. Carvalho and D. R. Chettle, *J Environ Monit*, 2002, **4**, 194–201
14. D.Chettle, *X-ray Spectrom.* 2005, **34**, 446–450.
15. Jr. L.Wittmers, A.C. Aufderheide, J.G. Pounds, K.W. Jones, and J.L. Angel, *Am. J. Phys Anthropol*, 2008, **136**, 379–386
16. L. Gerhardsson, A. Akantis, N. G. Lundström, G. F. Nordberg, A. Schütz, and S. Skerfving, *J. Trace Elem. Med. Bio.*, 2005, **19**, 209–215
17. D. J. Bellis, K. M. Hetter, J. Jones, D. Amarasiriwardena and P. J. Parsons, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2006, **21**, 948–954
18. J.B. Lambert, S.V. Simpson, J.E. Buikstra and D. Hanson, *Am. J. Physical Anthropology*, 1983, **62**, 409–413.